

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina Interna



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de estrategias basadas en técnicas moleculares y
test farmacológicos para la implantación de protocolos de
medicina personalizada en el tratamiento del mieloma
múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yanira Ruiz Heredia

Directores

Joaquín Martínez López
Juan Antonio Ballesteros Nobell

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO DE MEDICINA INTERNA



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS BASADAS EN TÉCNICAS MOLECULARES Y
TEST FARMACOLÓGICOS PARA LA IMPLANTACIÓN DE PROTOCOLOS DE
MEDICINA PERSONALIZADA EN EL TRATAMIENTO DEL MIELOMA
MÚLTIPLE.**

Memoria que para optar al título de Doctor en Medicina presentada por:

YANIRA RUIZ HEREDIA

Dirigida por:

JOAQUÍN MARTÍNEZ LÓPEZ

JUAN ANTONIO BALLESTEROS NOBELL

JOAQUÍN MARTÍNEZ LÓPEZ, MD, PhD, jefe de servicio de hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre y profesor titular de la Universidad Complutense de Madrid.

JUAN ANTONIO BALLESTEROS NORBELL, PhD y director científico de la empresa de biotecnología Vivia Biotech SL.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS BASADAS EN TÉCNICAS MOLECULARES Y TEST FARMACOLÓGICOS PARA LA IMPLANTACIÓN DE PROTOCOLOS DE MEDICINA PERSONALIZADA EN EL TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE.**” presentada por Yanira Ruiz Heredia para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos para ser evaluada.

Y para que conste y a efectos oportunos, firma el presente a 27 de enero de 2019.

Joaquín Martínez López

Juan Antonio Ballesteros Nobell

A mi madre

ÍNDICE

ABREVIATURAS	- 17 -
SUMMARY	- 21 -
RESUMEN	- 27 -
 1. INTRODUCCION	 35
 1.1 ASPECTOS GENERALES DEL MIELOMA MÚLTIPLE.....	 35
1.2 FACTORES PRONÓSTICOS EN EL MM	40
1.2.1 FACTORES PRONÓSTICOS DEMOGRÁFICOS, BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS.	40
1.2.2 FACTORES MORFOLÓGICOS, INMUNOFENOTÍPICOS Y DE EXPRESIÓN GÉNICA	41
1.2.3 FACTORES RELACIONADOS CON LA CALIDAD DE LA RESPUESTA	42
1.2.4 FACTORES CITOGENÉTICOS	44
1.3 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL MM.....	45
1.3.1 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS	46
1.3.2 PERFIL MUTACIONAL	48
1.4 EL ADN MITOCONDRIAL Y SUS ALTERACIONES MOLECULARES	51
1.4.1 INTRODUCCIÓN Y ASPECTOS GENERALES	51
1.4.2 MUTACIONES DEL ADNMT.....	53
1.4.3 NÚMERO DE COPIAS DE ADNMT	55
1.5 TRATAMIENTO DEL MM	56
1.5.1 AGENTES ALQUILANTES.....	57
1.5.2 GLUCOCORTICOIDES	58
1.5.3 INHIBIDORES DE PROTEOSOMA.....	59
1.5.4 AGENTES INMUNOMODULADORES.....	61
1.6 MEDICINA PERSONALIZADA.....	63
1.6.1 MEDICINA PERSONALIZADA EN CÁNCER	64
1.6.2 MEDICINA PERSONALIZADA EN EL MM.....	65

1.6.3	ESTRATEGIA DE MEDICINA PERSONALIZADA ALTERNATIVA A LOS ESTUDIOS MOLECULARES: TEST EX VIVO DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS.....	67
2.	<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</u>	75
3.	<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	81
3.1	ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN NUCLEAR	81
❖	ESTUDIO DEL ADN NUCLEAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA PARALELA.....	81
3.1.1	PACIENTES Y MUESTRAS	81
3.1.2	PURIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ADN	81
3.1.3	CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS:	82
3.1.4	PCR DE EMULSIÓN.....	86
3.1.5	SECUENCIACIÓN	87
3.1.6	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	88
3.1.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
3.2	ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN MITOCONDRIAL	93
3.2.1	ESTIMACIÓN NC DE ADNMT POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....	93
3.2.2	ESTIMACIÓN NC ADNMT A PARTIR DE SECUENCIACIÓN DE EXOMA Y GENOMA COMPLETO	95
3.2.3	ESTUDIO MUTACIONAL DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA REPLICACIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN PROFUNDA DIRIGIDA	98
3.3	ESTRATEGIA BASADA EN TEST FARMACOLÓGICOS.....	99
3.3.1	MUESTRAS PRIMARIAS DE PACIENTES	99
3.3.2	ENSAYO EX VIVO	99
3.3.3	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA EX VIVO:	102
4.	<u>RESULTADOS:.....</u>	113

4.1	ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN NUCLEAR	113
4.1.1	DESCRIPCIÓN DEL ESCENARIO MUTACIONAL: GENES Y RUTAS METABÓLICAS ALTERADAS.....	113
4.1.2	RECURRENCIA MUTACIONAL	116
4.1.3	ESTUDIO DE LA FRECUENCIA ALÉLICA	119
4.1.4	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	124
4.2	ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN MITOCONDRIAL:	127
4.2.1	ESTIMACIÓN DEL NC DE ADNMT EN LOS DISTINTOS ESTADIOS DEL MM MEDIANTE RT-PCR.....	127
4.2.2	VARIACIÓN DEL NC DE ADNMT CON LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD	129
4.2.3	EXPRESIÓN DE LOS GENES REGULADORES DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL	131
4.2.4	ESTUDIO MUTACIONAL DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA REPLICACIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN PROFUNDA DIRIGIDA	132
4.3	ESTRATEGIA BASADA EN TEST FARMACOLÓGICOS.....	134
4.3.1	DETERMINACIÓN DEL IMPACTO DEL NÚMERO DE CÉLULAS EN EL MODELADO POBLACIONAL DEL BORTEZOMIB.	134
4.3.2	ESTUDIO CINÉTICO DEL COMPORTAMIENTO EX VIVO DEL BORTEZOMIB.....	135
4.3.3	CONSTRUCCIÓN DE LOS MODELOS FARMACODINÁMICOS	140
4.3.4	APLICACIÓN DEL CÁLCULO AUC: COMPARACIÓN ENTRE FÁRMACOS.....	152
4.3.5	APLICACIÓN DE LOS MODELOS FARMACODINÁMICOS: ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA EX VIVO Y LA RESPUESTA CLÍNICA AL BORTEZOMIB.	154
5.	<u>DISCUSIÓN.....</u>	159
5.1	ESTRATEGIA BASADA EN ENSAYOS MOELCULARES	159
5.1.1	ESTUDIO DEL ADN NUCLEAR	159
5.1.2	ESTUDIO DEL ADN MITOCONDRIAL.....	165
5.2	ESTRATEGIA BASADA EN TESTS FARMACOLÓGICOS	169
5.2.1	MODELOS FARMACODINÁMICOS	169

6.	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>181</u>
7.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>186</u>
8.	<u>ANEXO.....</u>	<u>214</u>

ABREVIATURAS

Abreviaturas

CM: componente monoclonal

MM: mieloma múltiple

GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto

MMq: mieloma quiescente o “smoldering”

MMnd: mieloma múltiple de nuevo diagnóstico

MMr: mieloma múltiple en recaída

LCP: leucemia de células plasmáticas

CP: célula plasmática

CP-MM: célula plasmática de mieloma múltiple

MO: médula ósea

Ig: inmunoglobulina

LDH: lactato deshidrogenasa

ISS: International Staging System

SLP: supervivencia libre de progresión

SG: supervivencia global

FISH: Fluorescence In Situ Hybridation

CFM: citometría de flujo multiparamétrica

IMWG: International Mieloma Working Group

IGH: immunoglobulin heavy chain (gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas)

NGS: Next Generation Sequencing o secuenciación de nueva generación

FDA: Food and Drug Administration

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNn: ADN nuclear

ADNmt: ADN mitocondrial

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: PCR a tiempo real

WGS: whole genome sequencing (secuenciación de genoma completo)

WES: whole exome sequencing (secuenciación de exoma completo)

NC: número de copias

IMiD: Immunomodulator agent o agente inmunomodulador.

Rd: Lenalidomida + Dexametasona a bajas dosis

SUMMARY/ RESUMEN

Summary

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a hematological neoplasia that develops after transformation and excessive growth of plasma cells at the bone marrow. MM is characterized by a heterogeneous genetic abnormality and an extensive range of clinical outcomes. The development of more sophisticated therapeutic drugs such as immunomodulatory agent or proteasome inhibitors have expanded the clinical options for MM patients. However, the marked variability of responses to these treatments highlights the need to identify new biomarkers of response. Currently, most hospitals use conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization (FISH) to identified cytogenetic abnormalities. Nevertheless, the genetic aberrations detected by these methods have a limited prognostic value, justifying the incorporation of a more comprehensive method for the genetic screening into the diagnostic workup. The recent introduction of next-generation sequencing (NGS) technologies has considerably advanced our understanding of the biological features of MM. Targeted sequencing studies facilitate the detection of mutations in known genes, including those at low allele frequencies. Thus, it is an excellent tool to complement conventional molecular and cytogenetic approaches in the clinic routine. Targeted sequencing has been used to identify prognostic markers and achieve better patient stratification over the las few years. Despite of great efforts, it has not been found a clear relation between the presence of subclones and the sensitivity to treatments.

Additionally, it is widely known that cancer is also characterized by altered energy metabolism. The origin of this abnormality does not take place only in nuclear DNA, but also in mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA copy number changes. Recent studies have highlighted the critical role of mitochondrial alterations in patient outcome and response to treatment. Just a little is known about the state and contribution of mitochondrial abnormalities to the emergence and progression of MM.

On the other hand, therapy selection still relies in the clinical acumen due to the tumor molecular profile is not enough explored to drive treatment. Because of that, alternative approaches should be developed in order to help physician in such a difficult decision. In this regard, ex-vivo drug profiling by flow cytometry is postulating as an excellent tool to predict patient's response to treatment. It has been also used to find the best suitable dose-scheme for minimizing adverse effects and toxicity. Vivia biotech has developed *Exvitech*, a novel technology which allows for an automated and reproducible screening of live-cells count. Population model is applied to minimize the technical inter-patient variability, and whole patient sample is used to better reproduces the native tumor environment. Considering these three innovations, a more accurate and realistic pharmacodynamic drug profiling is achieved. Its proved capability of predicting response to treatment in acute myeloid leukemia patients has motivated its extension to other hematological neoplasia, such as multiple myeloma. Therefore, molecular and ex-vivo drug sensitivity data could shed further light on the unique properties of each patients and help to provide "the right treatment to the right person at the right time".

Aims

- 1.-Setting up a novel ultra-deep targeted sequencing strategy to explore the mutational landscape of MM patients and identify new prognostic factors and predictive biomarkers of response.
- 2.-Evaluate the status of mitochondrial DNA across all stages of MM by using novel and convectional techniques and explore its role in the progression and response to treatment.

3.- Constructing pharmacodynamic models for the most commonly used drugs in the treatment of myeloma, from ex vivo sensitivity assay by multiparametric flow cytometry.

Method:

We analyzed 79 tumor DNA samples from newly diagnosed MM patients enrolled in the GEM10MAS65 clinical trial. A targeted panel to 77 genes more frequently mutated in MM was used, obtaining an average coverage depth of 1600x. Two different bioinformatic pipelines were used for validation.

Mitochondrial DNA copy number was evaluated in 4 healthy donors and 135 patients corresponding to different states of the disease RT-PCR. Changes in mitochondrial DNA copy number were examined in patients progressing from Smoldering to multiple myeloma (10 patient, 20 samples) by whole-genome sequencing, and in sequential paired relapsed samples by whole-exome sequencing (21 patients, 44 samples).

Pharmacodynamic models were built for proteasome inhibitors, alkylating drugs, corticoids and immunomodulator agents by using NONMEM software. Several experimental analytical conditions were established to improve modeling quality.

Results

The NGS strategy developed here was able to identify 168 nonsynonymous missense/nonsense/stop-loss single variants in DNA from purified plasma cell from 79 patients. The 85% of patients harbored at least one mutation, with a median of 2.1 mutations per patient. Mutations were detected in 53 genes, although the following five 5 genes accounted for 42% of the total number of mutations: KRAS (21.5% of patients), DIS3 (19%), NRAS (16.5%), BRAF (10.1%) and TP53 (8.8%). The RAS pathway was the most recurrently mutated, altered in 48% (39/79) of patients, followed by NF-κB

pathway which accounted for the 15% of all mutations. Our cohort revealed a widespread subclonal spectrum, with 50% of variants (85/168) showing allele frequencies lower than 25%, and 27% (46/168) lower 10%. In addition, the total number of mutations, as well as mutations in TP53 and in genes related to Cereblon pathway were negatively associated with survival. The latter result was particularly noteworthy since Cereblon protein has been recently described as the target of immunomodulator agents and all patients enrolled in this phase II clinical trial were all treated with Lenalidomide, a second-generation immunomodulator.

On the other hand, the estimation of the mitochondrial DNA copy number by RT-PCR showed a significant increase in myeloma cells compared to healthy plasma cells (39 vs 228 copies; $P = 0.02$). The impact on survival was evaluated in 69 newly diagnosed patients and significant shorter progression free survival was found in patients with more than 400 mitochondrial DNA copies (21.6 vs 29.4 months [HR] 3.78; 95% [CI] 1.49-9.63, $P = 0.005$). An increase in mtDNACN was found in 9 out of 11 paired samples corresponding to the progression from smoldering to symptomatic myeloma, and in 17 out of 21 paired sequential release samples. Differential gene expression analysis was performed using a subset of samples corresponding to different stages of MM, confirming the over-expression of the mitochondrial biogenesis regulators compared to healthy plasma cells, mainly for TFAM and *c-MYC* genes.

Regarding the construction of pharmacodynamic models for describing the activity of drugs in a MM patient samples, we firstly focused the study on Bortezomib, the most used drug in the treatment of MM patients. We evaluated the impact of different parameters and conditions on the quality and accuracy of the pharmacodynamic model. We found that the initial number of pathological cells did not impact significantly on

model parameters. The best model to explain the experimental data was the free model, consisting on 4 parameters (EC50, Emax, Gamma and E0) with no constrains. 12 hours was the best time to describe the pharmacodynamic behavior of Bortezomib, providing the highest scores of accuracy and quality and the highest patient response stratification. Carfilzomib, Melphalan, Bendamustine and Cyclophosphamide models were also built, and an excellent goodness-of-fit was achieved. The ex vivo behavior of the two corticoid drugs assayed, Dexamethasone and Prednisone, could not be properly studied in nearly 70% of the samples due to their low cytotoxic activity (lack of effect) and its long mechanism of action, although their potential to enhance Bortezomib activity was clearly observed. Something similar was observed from immunomodulatory drugs such as thalidomide, Lenalidomide or pomalidomide, for which a limited cytotoxic effect even at long incubation time was detected in most patient samples. However, the anti-proliferative activity of Lenalidomide and pomalidomide was properly measured for first-time in patient samples after modifying the experimental assay. Under these new conditions, it was possible to evaluate the pharmacodynamic inhibition of MM cells proliferation in a preliminary set of samples. Different activity against proliferating and no proliferating cells was detected, and Pomalidomida was found to be almost 10 times more active than Lenalidomide as anti-proliferative agent.

Conclusions

-A subgroup of patients with poor outcome was properly identified by their mutational profile. The negative impact of the number of mutations and the present of mutation in *TP53* gene have been overlooked by conventional biochemistry and genetic test.

-Mutations in *CRBN* gene but also in genes related to Cereblon pathway seems to confer resistance to Lenalidomide activity. A greater set of patient needs to be analyzed to draw meaningful conclusions.

-The simplicity and affordability of this NGS strategy, together with the low sample requirement offers an excellent opportunity to introduce personalized medicine protocols into clinical practice. It also seems to be optimal for intensifying the search for new biomarkers and therapeutic targets, and so, improve treatment selection and patient survival.

-The increase of the mitochondrial content detected through the progression of the disease and its negative impact on patient survival appears to indicate that mitochondria play an important role in the pathogenesis and progression of the disease, showing a new vulnerability of the myeloma cells never reported so far.

-Model quality from most commonly used drug in MM suggest that optimal experimental conditions have been reached, including the one to measure the anti-proliferative effect of immunomodulatory drugs. This work represents a step toward to build a personalized medicine test which enables the prediction of the clinical response from ex vivo assays.

Resumen

El Mieloma Múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica más frecuente y se caracteriza por la proliferación descontrolada de células plasmáticas en la médula ósea. El reciente desarrollo de nuevas terapias ha permitido aumentar las opciones terapéuticas y mejorar considerablemente las expectativas de vida de estos pacientes, aunque todavía es incurable. La marcada variabilidad en la respuesta a los tratamientos y en la supervivencia los pacientes ponen de manifiesto la necesidad de identificar nuevos factores pronóstico y predictores de respuesta al tratamiento que permitan encontrar la mejor aproximación terapéutica para cada individuo, de manera personalizada. En este contexto, la reciente aparición de técnicas de secuenciación masiva del ADN como la secuenciación de nueva generación ha permitido conocer muy en profundidad las enormes variabilidades genéticas que presentan las células tumorales de mieloma, tanto entre pacientes como dentro de un mismo paciente. Sin embargo, mayores esfuerzos deber realizarse para poder encontrar nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores de respuesta al tratamiento, ya que actualmente la elección de este se basa en la pericia clínica del médico y no en base al perfil mutacional del tumor. Por este motivo están emergiendo otras estrategias alternativas. Una de las más interesantes y que mejores resultados ha reportado consiste en la predicción de la respuesta clínica de los pacientes a partir de ensayos in vitro, donde se estudia la actividad farmacológica de la droga en muestras de pacientes mediante citometría de flujo multiparamétrica. Además, el desarrollo de la respuesta farmacodinámica mediante modelos poblacionales ha revolucionado la industria farmacéutica por permitir solventar el problema de la variabilidad interindividual. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias de screening genético y farmacológico es una combinación

ideal para lograr un manejo personalizado del paciente, y así proporcionar “el tratamiento adecuado, a la persona adecuada y en el momento adecuado”.

Objetivos:

Objetivos:

- 1.- Desarrollo y aplicación de una estrategia basada en la secuenciación profunda dirigida mediante NGS para explorar el perfil mutacional de pacientes con MM e identificar factores pronósticos y biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento.
- 2.- Evaluación del ADN mitocondrial en células de mieloma mediante distintas metodologías y determinar por primera vez su implicación en la progresión de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento.
- 3.- Construcción de modelos farmacodinámicos poblacionales de las drogas más comúnmente empleadas en el tratamiento MM a partir de datos de sensibilidad ex vivo obtenidos por citometría de flujo multiparamétrica.

Método:

Se analizaron 79 muestras de ADN de células plasmáticas (CP) de pacientes de MM de nuevo diagnóstico reclutados en el ensayo clínico GEM10MAS65. Se aplicó un panel dirigido formado por los 77 genes más frecuentemente mutados en estos pacientes. La cobertura media por muestra fue de 1600x y se utilizaron dos estrategias de análisis bioinformáticos distintos.

El número de copias (NC) de ADN mitocondrial (ADNmt) se evaluó por RT-PCR en las CP de 4 donantes sanos, y de 135 pacientes con MM en distintos estadios de la enfermedad. También se examinaron cambios en el NC de ADNmt en muestras pareadas de pacientes correspondientes a la progresión MM quiescente-MM sintomático a partir de datos de

secuenciación de genoma completo (10 pacientes, 20 muestras). También se examinó estos mismos cambios en muestras pareadas de pacientes correspondientes a dos o más progresiones secuenciales a partir de datos de secuenciación de exoma completo (21 pacientes, 44 muestras).

Se construyeron modelos farmacodinámicos poblacionales para los inhibidores de proteosoma (Bortezomib y Carfilzomib), agentes alquilantes (Melfalán, Bendamustina y Ciclofosfamida), glucocorticoides (Dexametasona y Prednisona) mediante el uso del software NONMEN. También se crearon modelos individuales para describir la actividad anti-proliferativa de los agentes inmunomoduladores Lenalidomida y Pomalidomida.

Resultados:

La estrategia de NGS desarrollada y aplicada fue capaz de identificar 169 mutaciones no sinónimas en un 85% de los pacientes. La media de mutaciones por paciente fue de 2,1. Las mutaciones se detectaron en 53 genes, aunque solo 5 albergaron el 42% del total; KRAS (21.5% de los pacientes), DIS3 (19%), NRAS (16.5%), BRAF (10.1%) y TP53 (8.8%). La ruta de señalización RAS fue la más recurrentemente alterada en un 48% de los pacientes (39/79), seguida de la ruta NF- κ B con el 15% de las mutaciones. Esta cohorte también reveló un panorama subclonal muy extenso, donde el 50% de las mutaciones (85/168) presentaron frecuencias alélicas (FA) inferiores al 25%, y el 27% (47/168) FA por debajo del 10%. Además, se encontró que el número total de mutaciones (>3), las mutaciones en el gen TP53 y mutaciones en algunos de los genes relacionados con la ruta de señalización Cereblon conferían un pronóstico significativamente más desfavorable, con tiempos de recaída y muerte inferiores. Particularmente interesante fue encontrar el mal pronóstico conferido por alteraciones en Cereblon ya que este

gen/ruta es diana de el agente inmunomodulador Lenalidomida, y todos los pacientes de este ensayo clínico recibieron Lenalidomida.

Por otro lado, La estimación del NC de ADNmt por RT-PCR mostró un valor significativamente superior en las CP-MM que en las de paciente sano (39 vs 228 copias; $P = 0.02$). El impacto del contenido mitocondrial en la supervivencia se evaluó en 69 paciente de MM al diagnóstico, y se encontró que aquellos con mas de 400 copias de ADNmt progresaban significativamente antes que el resto (21.6 vs 29.4 meses. [HR] 3.78; 95% [CI] 1.49-9.63, $P = 0.005$). Se encontró un aumento en el NC de ADNmt en 9 de las 11 progresiones de pacientes con MMquiescente-MMsintomático evaluados, y en 17 de las 21 progresiones consecutivas pareadas de pacientes. Un análisis de expresión diferencial llevado a cabo sobre datos de expresión de arrays de grupos de muestras de pacientes en distintos estadios confirmó la sobreexpresión de los genes responsables de la regulación de la biogénesis mitocondrial con la progresión de la enfermedad, principalmente *TFAM* y *c-MYC*.

Respecto a la construcción de los modelos poblacionales, primeramente se evaluó el impacto de algunos parámetros y condiciones experimentales en la calidad de los modelos. Se encontró que el número inicial de células patológicas no impactó sobre los parámetros del modelo. Se encontró que un modelo farmacodinámico libre de restricciones y por tanto, con 4 parámetros (E_0 , E_{max} EC_{50} y Γ), era el que mejor describe el comportamiento de la actividad ex vivo del bortezomib proporcionando los mejores valores de calidad y precisión en el ajuste de los datos experimentales y la mejor estratificación de la actividad de los pacientes. Los modelos poblacionales del Carfilzomib, Melfalán, Bendamustina and Ciclofosfamida se construyeron con excelentes bondades de ajuste. El comportamiento ex vivo de los dos glucocorticoides

Dexametasona y Prednisona no pudo ser correctamente descrito por modelos poblacionales porque en cerca del 70% de las muestras la actividad fue demasiado baja y pareció requerir de tiempos de incubación muy largos. Sin embargo, sí se observó claramente su capacidad de potenciar la actividad del Bortezomib. Algo similar se encontró para los agentes inmunomoduladores, que mostraron una baja actividad citotóxica incluso a largos tiempos de incubación como 96h. Sin embargo, cuando se tuvo disponible un ensayo experimental donde se indujo proliferación de las CP-MM ex vivo, la actividad anti-proliferativa de la Lenalidomida y Pomalidomida si pudo ser evaluada. Se encontraron claras diferencias de actividad frente a células que proliferaban y células que no proliferaban, siendo la primera mucho mayor que la segunda, y siendo la actividad de la Pomalidomida muy superior a la de la Lenalidomida.

Conclusiones:

La estrategia de NGS desarrollada y aplicada en este trabajo permitió identificar grupos de pacientes con un pronóstico desfavorable de acuerdo con su perfil mutacional. Estos grupos de pacientes con pronóstico adverso habrían sido ignorados con el empleo único de test bioquímicos y genéticos convencionales.

-Mutaciones en la ruta Cereblon parecen conferir resistencia a la acción de la Lenalidomida. Este hallazgo debe ser confirmado en un número mayor de pacientes.

-La simplicidad y asequible coste de esta estrategia de NGS, junto con el bajo requerimiento de muestra ofrece una excelente oportunidad para introducir protocolos de medicina personalizada en la práctica clínica. Además, también demostró ser óptima para emplearla en la búsqueda de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas y así mejorar la selección del tratamiento y la supervivencia de los pacientes.

-El aumento del ADNmt con la progresión de la enfermedad y su impacto negativo en la supervivencia de los pacientes de MM parece indicar que la mitocondrial juega un papel fundamental en la patogénesis y progresión de la enfermedad. Esto revelaría una nueva vulnerabilidad de las células de MM nunca descrita antes. Además, estos pacientes podrían beneficiarse de la acción terapéutica de drogas dirigidas a estos targets en un corto plazo.

-La calidad de los modelos de las drogas más usadas en el tratamiento del MM sugieren que se han alcanzado las condiciones óptimas experimentales y analíticas, incluyendo los modelos individuales de los agentes inmunomoduladores en el ensayo de proliferación. Este trabajo representa un primer paso hacia la creación de un test de medicina personalizada que permita la predicción de la respuesta clínica del paciente a partir de la actividad ex vivo de cada droga.

1.- INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1 Aspectos generales del mieloma múltiple.

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad hematológica incurable caracterizada por la acumulación descontrolada de células plasmáticas (CP) en la médula ósea (MO) (1,2). Se clasifica dentro de las gammapatías monoclonales malignas, aunque el término con el que se le conoce comúnmente es MM debido a la afectación de múltiples huesos y áreas del organismo.

Estas CP clonales secretan una inmunoglobulina (Ig) anormal que se denomina proteína monoclonal o componente monoclonal (CM) (generalmente IgG o IgA), que puede estar constituida por una inmunoglobulina completa o por un fragmento de ésta (las cadenas ligeras kappa o lambda). El exceso de esta proteína se secreta en la sangre y/o en orina. Además se produce un exceso de cadenas ligeras que no se combinan con las cadenas pesadas las cuales poseen un peso molecular lo suficientemente bajo como para pasar libremente a la orina (3). Este exceso de cadenas ligeras se denomina mieloma Bence-Jones.

El cuadro clínico al diagnóstico de estos pacientes es grave, presentando dolor intenso de huesos, fracturas, debilidad, mareos, daños renales, anemias severas etc (2,4) (Tabla 1).

SÍNTOMAS	MANIFESTACIONES	CAUSAS	CONSECUENCIAS
Dolor óseo	Fracturas patológicas	Producción del factor activador de osteoclastos	Destrucción ósea, hipercalcemia
Neutropenia	Infecciones		Fiebre
Anemia Normocítica	Astenia, palpitaciones, debilidad, vértigo	Exceso de células plasmáticas en médula ósea y desplazamiento del resto de células sanguíneas	Palidez, taquicardia, taquipnea
Trombocitopenia	Hemorragias		Petequias, equimosis
Cefalea, confusión, convulsiones	Hiperviscosidad	Producción de proteína monoclonal anormal	Coma
Oliguria, nicturia, feto urémico	Insuficiencia renal	Eliminación por la orina de cadenas ligeras	Edema, ascitis
Parestesia, debilidad	Compresión radicular	Infiltración de células plasmáticas	Rigidez, paraplejia.

Tabla 1 Cuadro clínico de pacientes de MM al diagnóstico.

➤ Epidemiología y etiología

Corresponde al 1 % de todos los tumores y es la segunda neoplasia hematológica más frecuente (10-12%), responsable del 2% de las muertes totales por cáncer. La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 65 años (5). Su incidencia se sitúa en torno a 4 casos por cada 100.000 habitantes y año, aunque ésta es variable observándose una menor incidencia en la población asiática y una mayor incidencia en la población de los países occidentales más industrializados (6). El MM es más común en el género masculino que en el femenino (ratio 1,44:1). La mediana de supervivencia de estos pacientes es muy variable y depende de varios factores. La edad es uno de los primeros índices pronóstico: en pacientes con una edad media de 65 años la supervivencia global (SG) es de 4-6 años. Sin embargo, en pacientes jóvenes es de hasta 10 años (7,8). No obstante, el curso de la enfermedad puede ser muy variable y existe una gran heterogeneidad en la respuesta al tratamiento y la supervivencia (9).

Aunque la etiología del MM es aún desconocida, sí se sabe que existen factores de riesgo que potencian la probabilidad de aparición. Factores ambientales como puede ser la exposición prolongada a radiación a la que están sometidos supervivientes de bombas atómicas(10), o trabajadores expuestos a dosis bajas de radiación pero durante largos periodos de tiempo (11), aunque los datos publicados indican que estas causas tienen un papel secundario en la génesis de la enfermedad. Los factores relacionados con el estilo de vida como puede ser alcoholismo o tabaquismo se cree que también pueden influir si se producen conjuntamente con uno o más factores de riesgo, aunque por sí mismos tampoco se han relacionado con la aparición de la enfermedad. Algunos datos sugieren la existencia de cierta predisposición genética. Los familiares de enfermos de MM presentan mayor incidencia a padecer enfermedades autoinmunes y enfermedades degenerativas del sistema nervioso central(12). Otros factores que se han asociado débilmente con la enfermedad son la exposición repetida de un antígeno al sistema inmune (13) o la presencia de algún agente infeccioso (14), como el virus del herpes humano tipo 8 (15).

➤ **Estadios del MM**

El MM presenta estadios previos asintomáticos, que en muchas ocasiones no son detectados debido a la ausencia de síntomas, pero que se cree que siempre lo preceden (16,17). Estos estadios son: la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y el mieloma quiescente o indolente (MMq) (Tabla 2).

Designación	Definición
GMSI	<ul style="list-style-type: none"> • Pico M presente en suero < 3 g/dL • CPs clonales en MO < 10% • Ausencia de síntomas clínicos
Mieloma indolente	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento del pico M \geq 3 g/dL y/o CPs clonales en MO \geq 10% • Ausencia de síntomas clínicos
Mieloma activo	<ul style="list-style-type: none"> • Pico M en suero y/u orina • CPs clonales en MO \geq 60% (90% con fenotipo patológico por citometría de flujo) • Sintomatología derivada de la afectación orgánica (CRAB)
Leucemia de células plasmáticas	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de CPs patológicas en sangre periférica > 20%

Tabla 2 Estadios del MM y sus características clínicas y bioquímicas.

- Gammapatía monoclonal de significado incierto o GMSI (MGUS en inglés):

El perfil clínico y bioquímico de este estadio se describe en la Tabla 2. El paciente no presenta ninguna afectación orgánica característica del MM. El riesgo de progresión a MM es del 1% al año. Los pacientes con GMSI no reciben ningún tratamiento, solo un seguimiento periódico. Sin embargo, la introducción de análisis genéticos y de perfilado de expresión génica han permitido conocer que la mayoría de los cambios detectados en las CP de MM sintomático también están presentes en las CP de GMSI (18,19).

- Mieloma Indolente o quiescente (MMq o Smoldering en inglés):

Es el estadio inmediatamente anterior al MM sintomático. Los pacientes tampoco muestran signos evidentes de afectación orgánica, aunque los parámetros bioquímicos se acercan más a los valores propios del MM (Tabla 2). El riesgo de progresión a MM en este estadio es del 10% en un año, aunque estos datos varían en función del tipo de MM y de las peculiaridades moleculares de las CP de cada paciente (17,20,21). Históricamente estos pacientes no reciben ningún tratamiento, solo un seguimiento

periódico estrecho que permite una rápida detección de aumento en los niveles de CM o la aparición de alguna sintomatología asociada al MM (22). Sin embargo, estudios llevados a cabo en los últimos años demostraron que el tratamiento precoz es capaz de retrasar la progresión a MM sintomático con éxito. (23,24).

➤ Evolución clínica

El MM aparece cuando tanto la CM como la infiltración medular se disparan y comienza a aparecer la sintomatología detallada en la Tabla 1. Tras su diagnóstico, los pacientes reciben una línea de tratamiento y si es efectiva, la sintomatología comienza a desaparecer y los valores bioquímicos comienzan a normalizarse. Sin embargo, la trayectoria de un paciente con MM se caracteriza por la aparición de sucesivas recaídas que requieren de nuevo la administración de un tratamiento farmacológico que frene los síntomas y la progresión de la enfermedad (Figura 1) (25–27).

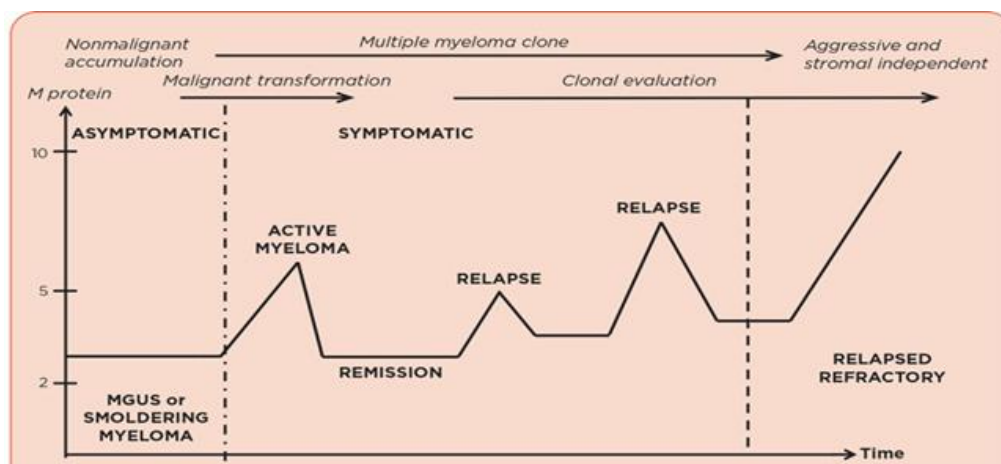


Figura 1 Evolución clínica característica de un enfermo de MM. Fuente Agarwal & Ghobrial 2013, Borello 2012, Keats 2012 y Durie et al 2003.

El último estadio de la enfermedad se podría considerar la leucemia de células plasmáticas (LCP), que es la salida a la sangre de las células tumorales (28). No siempre

precede a la muerte del paciente, pero cuando ocurre se produce la muerte en un breve periodo de tiempo. Si el tratamiento administrado es efectivo, las recaídas pueden espaciarse mucho en el tiempo. Sin embargo, si el tratamiento es poco efectivo, se producen en cortos periodos de tiempo y, en el peor de los casos, los pacientes se muestran refractarios y nunca llegan a alcanzar una respuesta suficiente que permita controlar la enfermedad y evitar su muerte.

1.2 Factores pronósticos en el MM

La enorme variabilidad en la respuesta al tratamiento de los pacientes con MM hace que la identificación de factores pronósticos sea de gran importancia tanto para la identificación de grupos con diferente riesgo de progresión como para entender más en profundidad la patogenia de la enfermedad.

Los factores pronósticos empleados en el MM se pueden agrupar en 4 grupos que dependen tanto de las características propias del paciente como de la biología del tumor.

1.2.1 Factores pronósticos demográficos, bioquímicos y clínicos.

Es ampliamente conocido el valor pronóstico que aportan las características propias de cada paciente, como puede ser la edad al diagnóstico, estado general de salud y la presencia de comorbilidades (29). Además, factores bioquímicos como la hemoglobina, la creatinina, la albúmina, la proteína-C reactiva, la lactato deshidrogenasa (LDH) o el calcio entre otros también han demostrado, aunque de manera limitada, estar relacionados con la carga tumoral y con algunas de las manifestaciones clínicas (30). Existen varios sistemas de clasificación que se basan en los factores pronósticos mencionados anteriormente. Uno de los más antiguos es el *Durie-Salmon*, que define

diferentes clasificaciones de riesgo en función de los niveles de hemoglobina, calcio, creatinina, CM y número y tamaño de lesiones óseas (31); o el *International Staging System* (ISS) que desde 2005 se ha convertido en el más empleado por su alta reproducibilidad y por tener en cuenta la concentración sérica de β 2-microglobulina, parámetro bioquímico que mejor correlaciona con la masa tumoral del paciente (32).

1.2.2 Factores morfológicos, inmunofenotípicos y de expresión génica

En la actualidad, el abanico de técnicas disponibles para estudiar la morfología e inmunofenotipo de las CP-MM es muy amplio, encontrando desde técnicas sencillas como el análisis citomorfológico del aspirado medular mediante microscopia óptica convencional (33,34), hasta técnicas complejas como la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) (35,36) o el estudio de patrones de expresión génica (37,38).

Morfológicamente se ha comprobado que existe asociación entre una morfología plasmoblástica con un peor pronóstico, aunque en muchos casos no se observan estas diferencias entre las CP sanas y las de CP-MM y su valor pronóstico es limitado.

La CFM ha proporcionado herramientas más útiles para la clasificación pronóstica de los pacientes de MM. En un análisis llevado a cabo en una serie de 685 pacientes de MM homogéneamente tratados se demostró que la expresión de CD19 y CD28, sumados a la falta de expresión de CD117 se asociaba a peores valores de SLP y SG (35). Aunque estos descubrimientos aún se encuentran en desarrollo y necesitan técnicas alternativas para ser considerados en la predicción pronóstica.

El desarrollo de estudios de expresión génica ha proporcionado una notable mejora en la estratificación del pronóstico de los pacientes comparado con los parámetros bioquímicos y de estadiaje explicados en el apartado anterior. Sin embargo, la implementación de esta aproximación en el entorno clínico presenta ciertas

dificultades, tanto por la cantidad de muestra requerida como por la cualificación del personal para la interpretación de los resultados (38).

1.2.3 Factores relacionados con la calidad de la respuesta

Generalmente existe una buena correlación entre el grado de respuesta al tratamiento y la supervivencia, siendo ésta más optimista cuanto más rápida y profunda es la respuesta al tratamiento (39). A continuación, se detallan los criterios actualmente empleados en la evaluación de la respuesta clínica alcanzada por pacientes de MM definidos por el *International Mieloma Working Group* (IMWG) en 2006.

❖ Respuesta completa (RC)

- Inmunofijación negativa en suero y orina y
- Desaparición de plasmocitomas en tejidos blandos y
- Porcentaje de CP en MO $\leq 5\%$

Las nuevas técnicas moleculares actuales han permitido llegar a niveles de respuesta completa más profunda describiéndose la llamada *respuesta molecular*, donde además de los criterios de RC se debe alcanzar negatividad cuando se evalúa la enfermedad mínima residual por ASO ASO-PCR o NGS.

❖ Muy buena respuesta parcial (MBRP)

- CM detectable en suero y orina por inmunofijación, pero no en electroforesis.
- Reducción del 90% o mayor del CM sérico más un nivel de CM en orina < 100 mg/24 horas.

❖ Respuesta parcial (RP)

- Reducción $\geq 50\%$ del CM en suero y reducción del CM en orina de 24 horas $\geq 90\%$ o < 200 mg/24 horas.

- Si el CM en suero y orina no es medible, se requiere una disminución $\geq 50\%$ en la diferencia entre los niveles de FLC en sustitución
- Si el CM en suero y orina no es medible, y FLC tampoco es medible, se requiere una disminución $\geq 50\%$ de CP, si el valor basal fue $\geq 30\%$ en MO, en sustitución del criterio de CM.
- Si existían plasmocitomas, se requiere una reducción $\geq 50\%$ de su tamaño.

❖ Enfermedad estable (EE)

- No cumple criterios de respuesta completa, muy buena respuesta parcial, respuesta parcial o enfermedad progresiva.

❖ Enfermedad progresiva (EP)

Requiere uno o más de los siguientes:

- Incremento de $\geq 25\%$ del valor basal en
 - CM en suero y/o (el incremento absoluto debería ser ≥ 0.5 g/dL)
 - CM en orina y/o (el incremento absoluto debería ser ≥ 200 mg/24h)
- Sólo en pacientes sin niveles de CM en suero y orina: la diferencia entre el nivel de FLC. El valor absoluto debería ser > 10 mg/dL.
- Porcentaje de CP en MO: el valor absoluto deberá ser $\geq 10\%$
- Claro desarrollo de nuevas lesiones óseas o plasmocitomas de tejidos blandos o claro incremento en el tamaño de las lesiones óseas existentes o de los plasmocitomas.
- Desarrollo de hipercalcemia (calcio corregido > 11.5 mg/dL ó 2.65 mmol/L) que pueda ser atribuido únicamente a la enfermedad

❖ Recaída clínica

Requiere uno o más de los siguientes:

- Los indicadores directos de incremento de la enfermedad y/o disfunción de órganos

(CRAB)

- Desarrollo de nuevos plasmocitomas de tejidos blandos o lesiones óseas.
- Incremento en el tamaño de plasmocitomas o lesiones óseas, definido como un aumento del 50% (y al menos 1 cm)
- Hipercalcemia (>11.5 mg/dL) (2.65 mmol/L)
- ❖ -Descenso de hemoglobina de ≥ 2 g/dL (1.25 mmol/L)
- Creatinina sérica igual o mayor a 2 mg/dL ($177\mu\text{mol/L}$)

1.2.4 Factores citogenéticos

El MM es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de un gran número de alteraciones genéticas, muy variables entre pacientes y también entre los distintos estadios de la enfermedad dentro de un mismo paciente.

De las muchas alteraciones citogenéticas que presentan las CP-MM, algunas de las que recurrentemente han sido relacionadas con un pronóstico adverso son las translocaciones que implican al gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*) como la $t(4;14)(p16;q32)$ y $t(14;16)(q32;q23)$, presentes en un 10 y 30% de los pacientes respectivamente (40,41), y la delección del 17p ($\text{del}17p$) que afecta al 10% de los pacientes (36,37). Otros autores también encontraron asociaciones de mal pronóstico en la delección 13q (42,43) y la ganancia 1q (44).

Las anomalías citogenéticas junto con la edad y el ISS han sido el pilar en la que se ha basado la estratificación de riesgo (45). Sin embargo, con la aparición de nuevos tratamientos de última generación, como los inhibidores de proteosoma, agentes inmunomoduladores o la introducción de los trasplantes autólogos, su valor pronóstico se ha visto comprometido y necesita ser reevaluado (46).

Gracias a la aparición de las nuevas técnicas moleculares, como los microarrays de ARN o la secuenciación de nueva generación (NGS) esto ya se está llevando a cabo, y se está ampliando el número de marcadores pronóstico.

1.3 Alteraciones moleculares en el MM

Hasta hace pocos años, se asumía que el cáncer, y también el MM, era una enfermedad por pasos donde existía una evolución lineal de clon celular patológico, el cual adquiría alteraciones genéticas y mutaciones con el tiempo siguiendo los principios darwinianos de variación genética aleatoria (47). Se hipotetizaba que la célula cancerígena se originaba de una célula fundadora la cual progresivamente acumulaba mutaciones aleatorias dando lugar a unas series de poblaciones subclonales que existían en equilibrio. Esos subclones competían por los recursos limitados del microambiente y eran seleccionados en función de su capacidad de adaptación.

En los años 1990, la Clínica Mayo publicó un estudio llevado a cabo sobre una línea celular obtenida a partir de sangre periférica de un enfermo con LCP donde claramente se identificó la presencia de dos poblaciones subclonales distintas aunque genéticamente relacionadas (Figura 2) (48). Desde entonces el concepto de evolución clonal ha sido redefinido y validado a través de análisis genéticos y epigenéticos (49).

Recientemente, el desarrollo de técnicas de alta resolución como los arrays CGH o la NGS han permitido explorar los conceptos de células madre del cáncer, poblaciones subclonales, la inestabilidad genómica, epigenómica, así como el impacto del microambiente en la evolución clonal del cáncer (50,51). En el caso concreto del MM, la accesibilidad a muestras de pacientes en distintos estadios de la enfermedad proporcionó la oportunidad de realizar un seguimiento de la historia natural de la

evolución clonal con el tiempo, e incluso relacionarla con el pronóstico y la respuesta al tratamiento (52,53) .

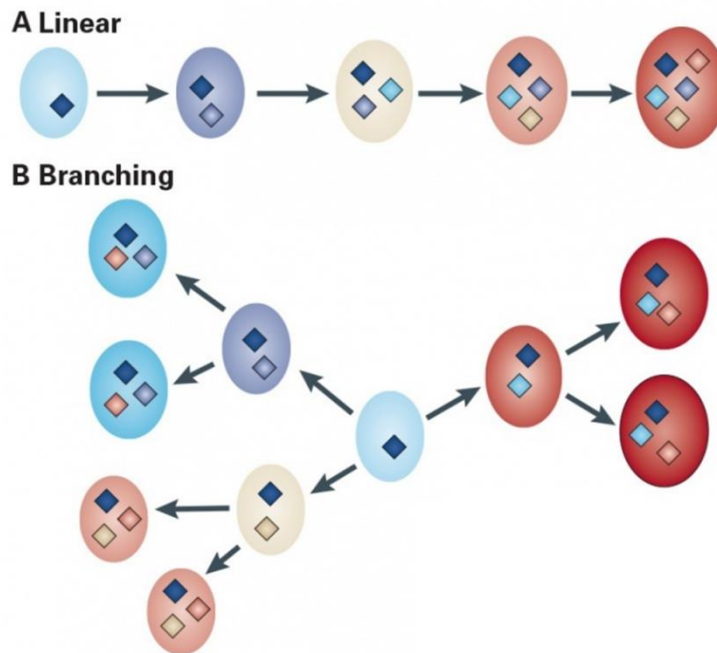


Figura 2 Opciones de evolución clonal de las CP-MM A) Evolución lineal que consiste en la adquisición y acumulación de mutaciones con el transcurso de la enfermedad. B) Evolución ramificada que refleja como las mutaciones pueden ganarse o perderse aleatoriamente, originando distintos subclones con fuertes diferencias en su perfil mutaciones. Fuente Morgan et al Rev Cancer 2012; 12:335-348

1.3.1 Alteraciones citogenéticas

El MM es una enfermedad que se caracteriza por una gran inestabilidad y heterogeneidad cromosómica. Estas células presentan tanto aberraciones cariotípicas cuantitativas, que afectan al número de cromosomas, como estructurales, presentando amplificaciones, deleciones y translocaciones de ciertas regiones cromosómicas (Figura 3). Estas alteraciones son detectadas en los diferentes estadios de la enfermedad, desde los estadios no sintomáticos como el GMSI o el MMq hasta el MM sintomático. Algunas se detectan en la fase inicial de la transformación maligna de la CP-MM, donde su capacidad proliferativa e invasora es menor mientras que otras lo hacen más tarde

cuando aparece la sintomatología o en algunos casos la refractariedad al tratamiento. Una misma anomalía puede tener un impacto diferente en función del estadio de la enfermedad en el que se presente. Por ejemplo, la trisomía en MMq implica un alto riesgo de progresión a MM mientras que si aparece en el MM pronostica un bajo riesgo de progresión.

Existen dos grupos principales de alteraciones citogenéticas: las primarias que aparecen también en estadios asintomáticos como la GMSI y MMq, y las secundarias que ocurren en cualquier tipo de MM y además pueden presentarse varias simultáneamente en un mismo paciente.

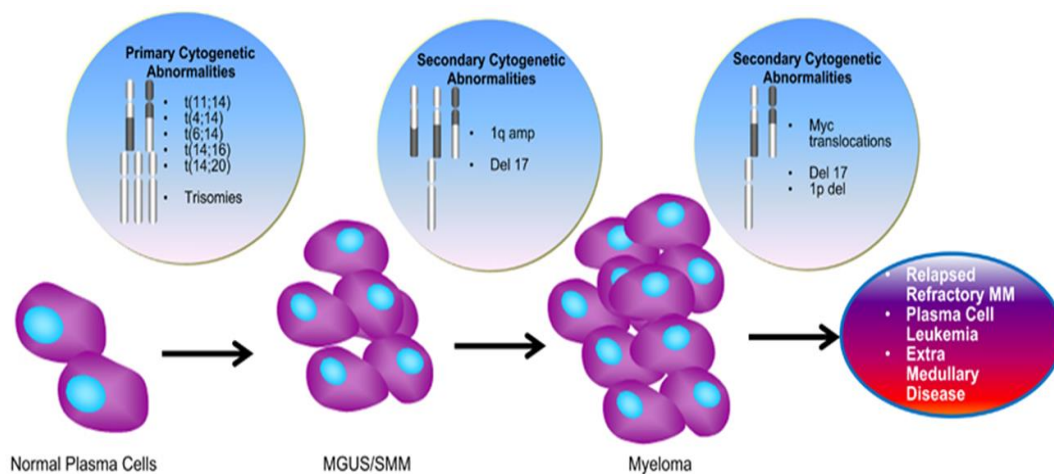


Figura 3 Aberraciones citogenéticas en el MM. Fuente Rajan A M et al, Blood Cancer Journal, October 2015, 5(10):e365.

➤ Alteraciones primarias:

Engloban principalmente las trisomías y los reordenamientos de la cadena pesada de las Ig (*IGH*). Las trisomías se caracterizan por la presencia de una copia extra de uno o varios cromosomas, generalmente los impares (3, 5, 7, 9, 11, 15, 17). El gen *IGH* se sitúa en la región 14q32 y las más comunes son t(11;14), t(4;14), t(6;14), t(14;16) y t(14;20). Los genes que se ven afectados por estas translocaciones son *CCND1*, *FGFR-3*, *CCND3*,

c-MAF y *MAF-B*, respectivamente. No es frecuente encontrar un paciente que presente alguna de estas translocaciones o trisomías simultáneamente. Las translocaciones asociadas a un mejor pronóstico son la *t(11;14)*, *t(4;14)*, y *t(6;14)* presentes en un 10% de los pacientes y a un mal pronóstico las *t(4;14)* y encontradas en un 5% de los pacientes. La prevalencia de estas translocaciones varía con el estadio de la enfermedad, en GMSI o MMq se encuentran entre un 45-50% de los pacientes, en MM intramedular entre un 55 y 73% y en LCP en más de un 85 % de los pacientes.

➤ **Aletraciones secundarias:**

Estas alteraciones aparecen en cualquier estadio de la enfermedad y simultáneamente con otras alteraciones secundarias. Algunas de las más comunes son la monosomía del 13 o del(13q), que se detecta en un 50% de ellos y confieren un pronóstico desfavorable a los pacientes. Deleciones del 17p o del(17p) que son descritas ampliamente como un evento adverso de la supervivencia. Se encuentran en un 10% de los pacientes de nuevo diagnóstico, aunque esta cifra aumenta en pacientes en recaída o refractariedad. La duplicación del (1q21) o la ganancia (1q21), presente en más del 40% de los pacientes con MMq o MM sintomático, mientras que no es común en GMSI, por lo que se relaciona con la progresión de la enfermedad. Las translocaciones de *MYC* también son frecuentes y se asocian a pronóstico adverso.

1.3.2 Perfil mutacional

Como se ha detallado en el apartado anterior, el MM presenta aberraciones cromosómicas muy frecuentes y ampliamente estudiadas. Sin embargo, estas alteraciones son insuficientes para explicar la transformación maligna que sufren las CP-MM ya que están también presentes en los estadios asintomáticos de la enfermedad.

Uno de los primeros estudios en los que se utilizó la NGS para describir el perfil genético de enfermos de MM fue llevado a cabo por Todd Golub en 2011 (54). Secuenció el genoma completo de 38 pacientes de MM, tanto de nuevo diagnóstico como en recaída. Encontró 10 genes alterados con significancia estadística que presentaban mutaciones no sinónimas, entre los cuales se encontraban genes de la familia Ras como *KRAS*, *NRAS* en el 50% de los pacientes y también genes que estaban afectados por algunas de las aberraciones cromosómicas descritas previamente, como *TP53* con (del17p) y *CCND1* con t(11;14). También encontró nuevos genes que nunca habían sido relacionados con la enfermedad, como *DIS3* y *FAM46C*, los cuales están implicados en los procesos de homeostasis del ARN mensajero y traducción de proteínas. Otra ruta biológica que encontró significativamente alterada fue la ruta NF-κB y la ruta de modificación de histonas. Estudios posteriores en cohortes mayores de pacientes confirmaron la presencia de mutaciones en estos genes. N Bolli en 2013 (55) secuenció el exoma completo de 67 pacientes de MM, 15 de ellos con muestras seriadas disponibles lo que le permitió describir ampliamente el panorama mutacional y sus patrones de evolución clonal. Bolli reportó que las CP-MM compartían mutaciones a lo largo del tiempo y adquirían otras nuevas, sugestivo de la existencia de un progenitor común y una posterior evolución clonal. Además, señaló que la mitad de las mutaciones en *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *FAM46C* y *TP53* estaban presentes en el clon fundador y la otra mitad aparecía de *novo* en estadios posteriores, o aumentaban su frecuencia convirtiéndose en el clon dominante. Más recientemente, Walker en 2015 secuenció el exoma completo de 463 pacientes de nuevo diagnóstico y cuyo tratamiento era conocido. Encontró que a pesar de que los genes en la ruta Ras y NF-κB suponían un 60% del total, no tenían ningún impacto sobre la supervivencia de los pacientes, aunque sí señalaba el

interés de estos genes como posibles dianas terapéuticas. Encontró que mutaciones en genes implicados en la ruta de reparación del ADN como *TP53*, *ATM*, *ATR* y *ZNFHX4* conferían un pronóstico desfavorable mientras que otros como *IRF4* y *EGR1* se asociaban a mejores supervivencias. Además, establecieron un nuevo sistema de estadiaje combinando los resultados mutacionales obtenidos en su estudio con los ya conocidos hasta el momento, permitiendo identificar a pacientes de alto riesgo con mejores resultados que lo existente hasta el momento.

Por otro lado, la Clínica Mayo ha sido pionera en la publicación de trabajos donde la tecnología de secuenciación utilizada no era WES o WGS sino una secuenciación dirigida hacia los genes concretos de interés, permitiendo así una mayor profundidad de lectura y por tanto la detección de mutaciones a bajas frecuencias alélicas. Esta tecnología requiere una menor cantidad de muestra y presenta un coste inferior. De esta manera, Kortum et al en 2016 presentó un trabajo en el que estudiaron el perfil mutacional de 142 pacientes de nuevo diagnóstico aplicando un panel dirigido que contenía los 77 genes más frecuentemente mutados en MM. Reportaron resultados similares a los obtenidos mediante WES o WGS, pero disminuyendo muchísimo el coste y la cantidad de muestra empleada. Además, encontraron que existía un gran número de mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS*, *DIS3* a bajas frecuencias alélicas que no podrían haber sido detectados por otras técnicas de secuenciación.

Aun así, a pesar de los esfuerzos que se están realizando por comprender el papel de estas mutaciones y su impacto pronóstico, la cohorte de pacientes estudiados presenta cuadros clínicos muy heterogéneos (diferentes edades, comorbilidades...) y reciben diferentes esquemas de tratamiento, dificultando mucho la asociación entre la presencia de una alteración genética con la respuesta al tratamiento o la supervivencia.

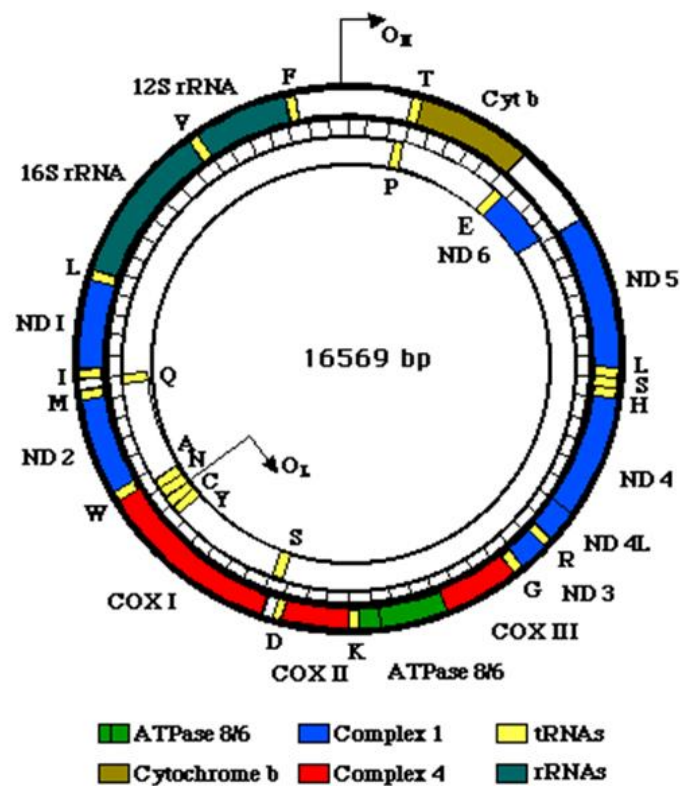


Figura 4 Representación esquemática del genoma mitocondrial humano. Fuente Cann RL et al. Nature. 1987 Jan 1-7;325(6099):31-6.

numerosos estudios han evaluado el papel que juega la mitocondria en la aparición y desarrollo del cáncer. En 1942 Otto Warburg describió que las células tumorales metabolizaban la glucosa de manera distinta a como lo hacían las células sanas, produciendo energía principalmente a través de glucólisis anaerobia y posterior fermentación láctica en lugar de oxidación del piruvato por ciclo de Krebs en la mitocondria (59) (Figura 5). Warburg postuló por primera vez que la actividad bioenergética mitocondrial podría estar alterada en las células cancerígenas, y esta conclusión dio pie a la realización de multitud de trabajos con el fin de comprender el papel de las alteraciones mitocondriales en cáncer (60,61).

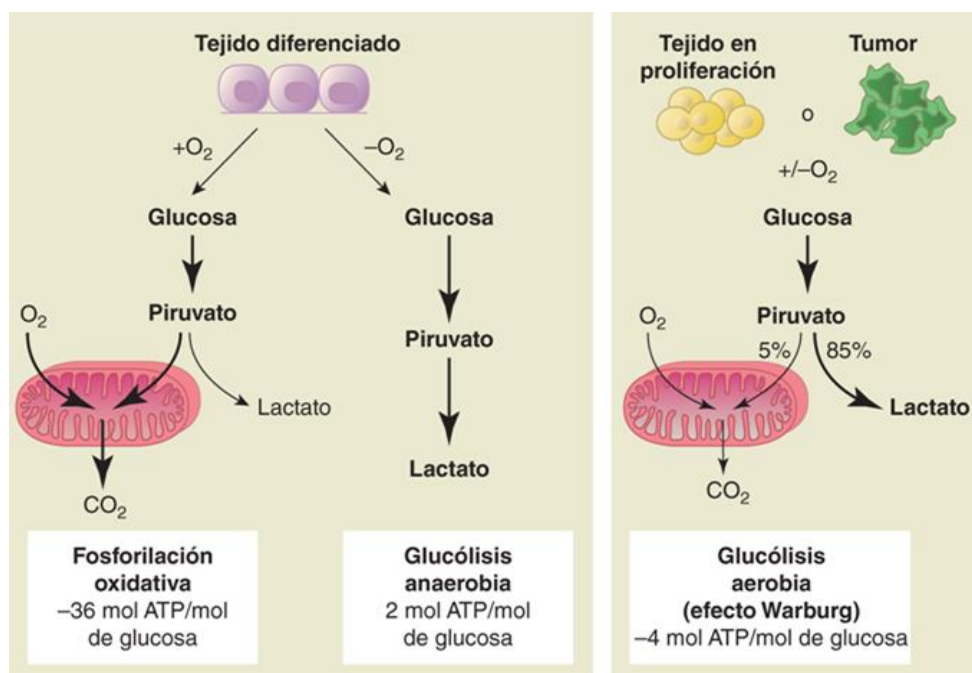


Figura 5 Esquematización del denominado "Efecto Warburg" observado en células cancerosas. Fuente Denis L. Casper et al. Harrison, principios de medicina interna.

Más recientemente y gracias a la mejora en las técnicas bioquímicas y moleculares, se descubrió que las células cancerígenas presentaban multitud de alteraciones mitocondriales, en términos de contenido, estructura, función y actividad (57,60–65).

Las causas más comunes que provocan estas disfunciones mitocondriales en cáncer son las alteraciones en el ADNmt (62). Esto es debido a tres factores principalmente: el interior de la matriz mitocondrial donde se localiza el ADN se encuentra muy expuesto a los radicales libres producidos en el proceso de respiración celular, los cuales tienen una alta capacidad de provocar modificaciones irreversibles en la cadena de ADN. Además, el ADNmt no presenta la protección de las histonas ni de la estructura de cromatina que sí presenta el ADNnu y, por último, carece de los sofisticados mecanismos de reparación que presenta el ADNnu, de manera que estos daños no pueden ser detectados y corregidos. Todo esto hace que el ratio de mutaciones del ADNmt sea mayor del doble que el del ADNnu (62).

1.4.2 Mutaciones del ADNmt.

El material genético mitocondrial es heredado exclusivamente de la madre, por lo que al nacimiento la mayoría de las copias de ADNmt son idénticas y se habla de un estado de homoplasmia. Con el tiempo, y por los motivos descritos anteriormente, se producen alteraciones de este estado original y se comienza la coexistencia de copias originales y copias mutantes estableciéndose un estado de heteroplasmia. Con las sucesivas replicaciones celulares, las proporciones de hebra original y mutante van cambiando, ya que el ADNmt se distribuye aleatoriamente entre las dos células hijas y, por tanto, el estado de heteroplasmia varía de generación en generación. Existe un determinado valor de heteroplasmia a partir del cual el efecto de las copias originales ya no puede compensar el de las copias mutantes y la célula comienza a expresar el fenotipo mutante (63,66,67). El mecanismo por el cual se produce este enriquecimiento selectivo de un fenotipo sobre el otro sigue siendo desconocido, pero se cree que el ADNmt mutante

podría conferir algún tipo de ventaja en el crecimiento y supervivencia de las células tumorales (63,64).

Sin embargo, la presencia de mutaciones sinónimas que no generan cambio de aminoácido en células tumorales sugiere que algunas mutaciones perduran a pesar de no implicar ninguna ventaja selectiva. También se ha reportado que la presencia de ADNmt mutante provoca daños en el funcionamiento de la cadena respiratoria y esto, de manera colateral, podría conferir a las células cierta protección frente a la apoptosis al disminuir su sensibilidad a las señales pro-apoptóticas (68).

Las mutaciones que afectan al ADNmt en cáncer pueden tener un origen germinal o somático, habiendo sido los dos detectados en varios tipos de tumores (60). Un estudio publicado por Shidara et al en 2005 comprobó que la presencia de la mutación en el nucleótido 8993 ó 9176 del ADNmt, el cual codifica la subunidad 6 de la ATP sintasa provocaba un crecimiento mayor y más rápido de la línea HeLa en ratones desnudos, mientras que disminuía el ratio de apoptosis (69). Otro estudio publicado por Petros et al en 2005 mostró que la presencia de la mutación T8993G en el ADNmt de células de cáncer de próstata PC3 producía un aumento del crecimiento y de la producción de ROS comparado con las células sin dicha mutación (70). Y lo mismo fue reportado por Ishikawa et al en 2008, donde una mutación en la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa proporcionaba a las células tumorales una mayor capacidad invasiva sin elevar los niveles de ROS, y por tanto, evadiendo así la muerte natural vía apoptosis (71). El número de trabajos en el que se ha estudiado el impacto de las mutaciones en el ADNmt ha crecido considerablemente en los últimos años (72–74) y parece claro que las mutaciones del ADNmt confieren a las células tumorales capacidades que benefician la patogénia y el desarrollo e invasión del tumor.

1.4.3 Número de copias de ADNmt

A diferencia del ADNnu que presenta un número fijo de copias por célula, el número de copias (NC) de ADNmt depende de la demanda energética celular, de manera que tejidos muy activos como por ejemplo el cardíaco o el muscular presentan miles de copias por célula, mientras que el bazo y la sangre presentan cantidades muy inferiores (75,76). Por lo tanto, la cantidad de ADNmt puede servir como marcador subrogado de su capacidad oxidativa. El NC de ADNmt se ha convertido en fenómeno de estudio en multitud de tipos de tumores dentro del campo de investigación del cáncer.

El estudio descriptivo del NC de ADNmt en distintos tipos de tumores, como el de estómago, cuello, cabeza o colon (77–80) ha permitido conocer que esta variable varía significativamente en función del tipo de neoplasia. Varios meta-análisis llevados a cabo recientemente donde se han estudiado miles de muestras correspondientes a multitud de tipos de tumores han reportado que existen cambios significativos en el NC de ADNmt en el tejido tumoral con respecto a los tejidos adyacentes sanos (81). Sin embargo, el sentido de estas variaciones no es el mismo a lo largo de todos los tipos de tumores; algunos presentan disminución y otros un incremento con respecto al NC de ADNmt en el tejido sano. Además, el impacto pronóstico de esta variable también varía ampliamente en función del tipo de tumor; mientras que en adenocarcinoma cortical, glioma de bajo grado y carcinoma renal cromóforo se encontró que una mayor carga mitocondrial se relacionaba con un pronóstico positivo, en tumor renal de células claras y melanoma se relacionó con un pronóstico desfavorable (81). Por otro lado, estudios llevados a cabo en ratones con células tumorales demostraron que la carga mitocondrial confería al tumor una mayor velocidad de aparición y crecimiento (65). También se ha reportado que las células que adquirirían una mayor carga mitocondrial tenían una mayor

capacidad metastásica (71) y una mayor resistencia a la acción farmacológica de los agentes quimioterapéuticos (82,83) .

El mecanismo por el cual varía el NC de ADNmt no está claro, pudiendo estar inducido por un aumento del estrés oxidativo o por una compensación debido un mal funcionamiento de la maquinaria mitocondrial (79,84). También se postula que las mutaciones en la región *D-loop* podrían afectar a la velocidad de transcripción-replicación del ADNmt reduciendo el NC (84), así como la presencia de mutaciones en *TP53* o en el gen de la polimerasa gamma *POLG* (85,86). Todas estas alteraciones en el NC de ADNmt podrían afectar a numerosos procesos biológicos críticos para las células cancerígenas por lo que su estudio está siendo esencial para el entendimiento de la enfermedad y la búsqueda de nuevas terapias.

Sin embargo, debido a la gran dificultad que comprende el trabajo in vitro con CP-MM y también, la ausencia de CP sanas en los pacientes con MM, el estado del NC de ADNmt y su impacto pronóstico nunca ha sido evaluado en esta patología.

1.5 Tratamiento del MM

Las CP-MM podrían considerarse como una población heterogénea en la que existen diferentes clones que muestran distintos niveles de sensibilidad a los fármacos. Por este motivo, la estrategia seguida en el tratamiento de otros tumores donde un único fármaco es administrado para frenar la enfermedad es inviable. En los últimos años se han realizado grandes avances en el tratamiento de esta enfermedad con la incorporación de fármacos de diversa naturaleza que se administran al paciente de

manera conjunta o en distintas combinaciones y que han ayudado a prolongar su esperanza de vida (87,88).

1.5.1 Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes fueron de los primeros fármacos en demostrar actividad anti-MM y en la actualidad siguen siendo un componente esencial en cualquier tratamiento. El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en la alquilación (incorporación de grupos metilo) del ADN formando puentes intra e inter- catenarios que impiden la duplicación del ADN provocando una pérdida de funcionalidad y, por tanto, induciendo la apoptosis celular. Los más utilizados en el tratamiento del MM son la Ciclofosfámid, Melfalán y Bendamustina (Figura 6) (89,90) .

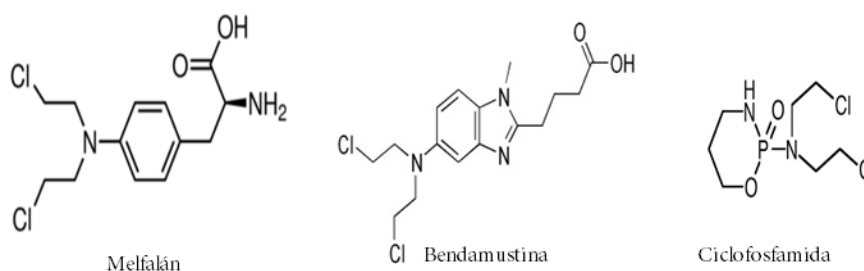


Figura 6 Estructura química de los agentes alquilantes más comúnmente empleados en el tratamiento del MM.

A pesar de su eficacia y de su extenso uso, existen pacientes que muestran resistencia al efecto de estos fármacos, bien directamente desde su primera administración, o bien adquirida tras una exposición continua. El mecanismo por el cual se establece la resistencia aún no es del todo conocido, pero se cree que radica en la capacidad del sistema de reparación del ADN de revertir la acción alquilante de estas drogas (91).

1.5.2 Glucocorticoides

Los corticoides son una variedad de hormona que corresponden al grupo de los esteroides (Figura 7). Intervienen en el mecanismo de síntesis de la glucosa, el metabolismo de las grasas y el desarrollo de los huesos, pero además tienen un enorme efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. Históricamente se han empleado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis, pero también en enfermedades autoinmunes como el lupus o la esclerosis múltiple (92,93). En las últimas décadas, se observó que además tenían un efecto positivo en el tratamiento de tumores, principalmente en el del MM, donde se sabe que además de paliar algunos de los síntomas propios de la quimioterapia habitualmente empleada en el tratamiento de la enfermedad, también induce la apoptosis de las CP-MM (94,95). A pesar de que existen varias hipótesis que explican el papel de los corticoides en la inducción de la apoptosis, el mecanismo real de acción es aún desconocido (96).

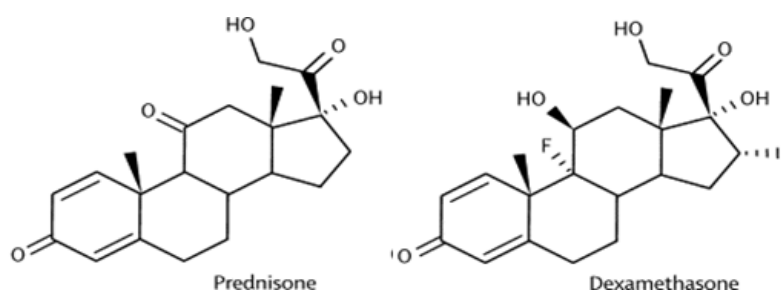


Figura 7 Estructura química de los agentes glucocorticoides más empleados en el tratamiento del MM.

Los corticoides habitualmente empleados en el tratamiento del MM son la Prednisona y la Dexametasona (Figura 7). Numerosos ensayos clínicos han demostrado la eficacia

de estos dos fármacos para aumentar la supervivencia de los pacientes, y en la actualidad son fármacos indispensables en los tratamientos anti-MM.

1.5.3 Inhibidores de proteosoma

El Bortezomib fue el primer inhibidor de proteosoma aprobado para el MM por *US Food and Drug Administration* (FDA) en 2003. Su eficacia ha sido demostrada tanto como tratamiento de primera línea como de posteriores y en pacientes que son refractarios a todos los tratamientos (95,97–99). El Carfilzomib fue aprobado en julio de 2012 y en la actualidad se emplea fuera de primera líneas, principalmente en pacientes refractarios (100,101).

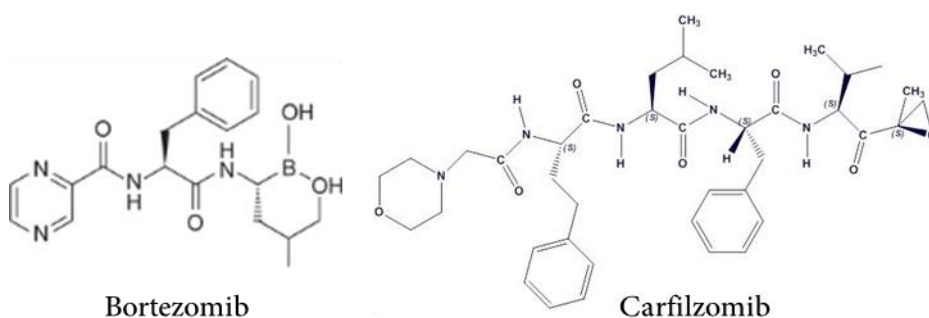


Figura 8 Estructura química del bortezomib y el Carfilzomib, los inhibidores del proteosoma más empleados en el tratamiento del MM.

Estos fármacos se unen específica y reversiblemente (Bortezomib) o irreversiblemente (Carfilzomib) al residuo de treonina de proteosoma 26S, un complejo enzimático que juega un papel crucial en la regulación de la degradación proteica (Figura 9). Las proteínas que la célula ya no necesita son marcadas con ubiquitina y finalmente degradadas. La inhibición de este complejo tiene como resultado la pérdida del balance proteico que induce la apoptosis celular (101–103).

También desregulan el metabolismo del calcio intracelular activando las caspasas e induciendo la apoptosis. Una de las razones por las que el Bortezomib funciona especialmente bien en MM es porque estabiliza el factor nuclear Beta, evitando que se transloque al núcleo y por tanto desactivando rutas importantes en la señalización de las CP-MM. Inhibe también la angiogénesis, la reparación del ADN y las deficiencias en la actividad de los osteoclastos

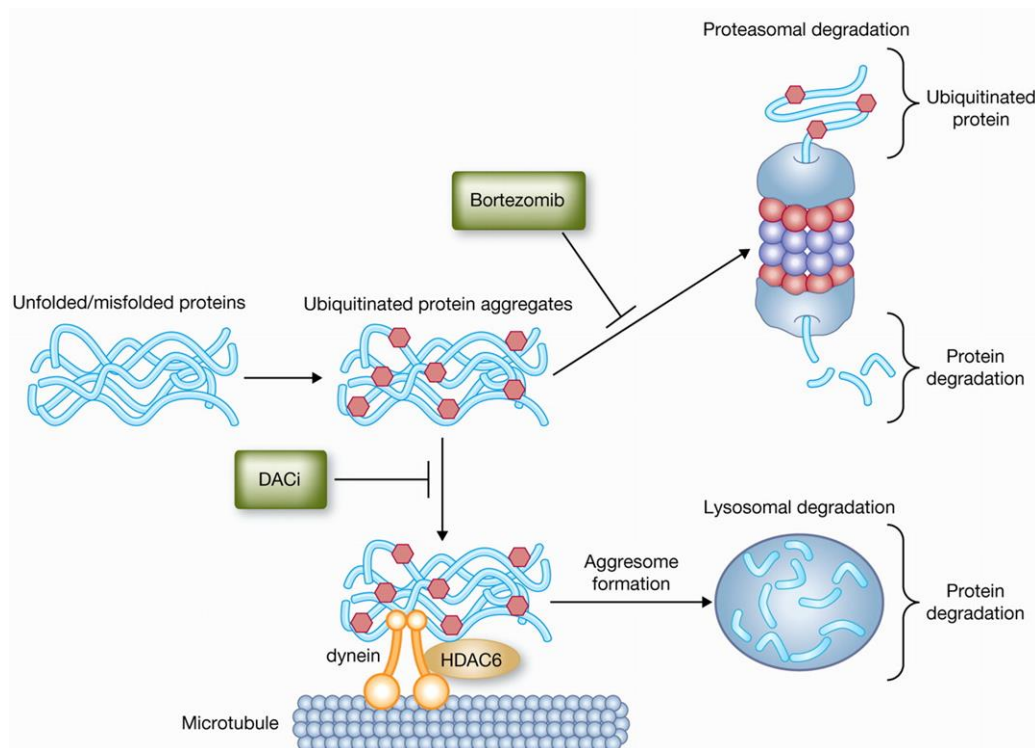


Figura 9 Mecanismo de acción de los inhibidores de proteosoma. Fuente American Association for Cancer Research 2011 y Hideshima T et al, Mol Cancer Therapy Nov 2011 10 (11).

A pesar del éxito de estos fármacos, existe un 20% de pacientes que en primera línea se muestra totalmente resistentes a su efecto antineoplásico y este porcentaje aumenta en líneas posteriores. A día de hoy aún se desconocen las bases moleculares que diferencian las respuestas al tratamiento con inhibidores del proteosoma observadas entre pacientes (104,105).

1.5.4 Agentes Inmunomoduladores

En los últimos años, estos fármacos se han puesto a la cabeza de las terapias empleadas contra el MM. El primero en emplearse fue la Talidomida, un derivado del ácido glutámico que había sido empleado como sedante y tratamiento para las náuseas matutinas de las embarazadas a mediados de los años 50. En 1999 apareció el primer estudio sobre la eficacia de este nuevo fármaco en el tratamiento del MM (106) y así dio comienzo la llamada era de los tratamientos de nueva generación. Después aparecieron la Lenalidomida y la Pomalidomida, demostrando una potencia de 50 a 200 veces superior a la Talidomida y con mejores efectos anti-MM, especialmente en el caso de MM refractarios (107,108).

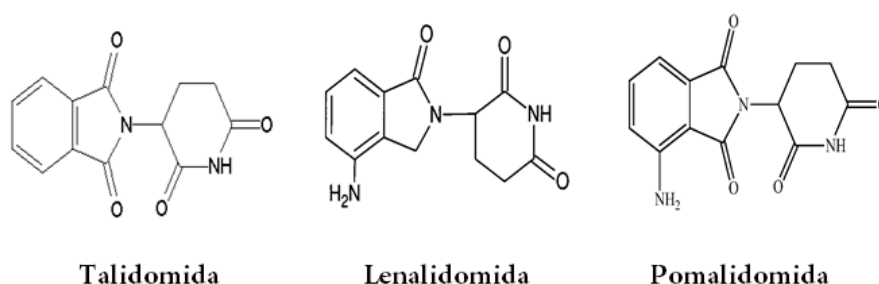


Figura 10 Estructura química de la Talidomida, Lenalidomida y Pomalidomida, los agentes inmunomoduladores más empleados en el tratamiento del MM.

Estos fármacos inhiben la angiogénesis, detienen el crecimiento celular y la proliferación, disminuyen la capacidad de adhesión de las células plasmáticas al estroma y activan las células inmunológicas NK y linfocitos T citotóxicos (109–111)(Figura 11). Además de su efecto sobre el sistema inmune, los agentes inmunomoduladores (IMiDs) también presentan una destacable actividad antiproliferativa a través de la activación

de genes supresores de tumores (112,113). También promueven la interrupción de las interacciones de las CP-MM con las células del microambiente del estroma medular.

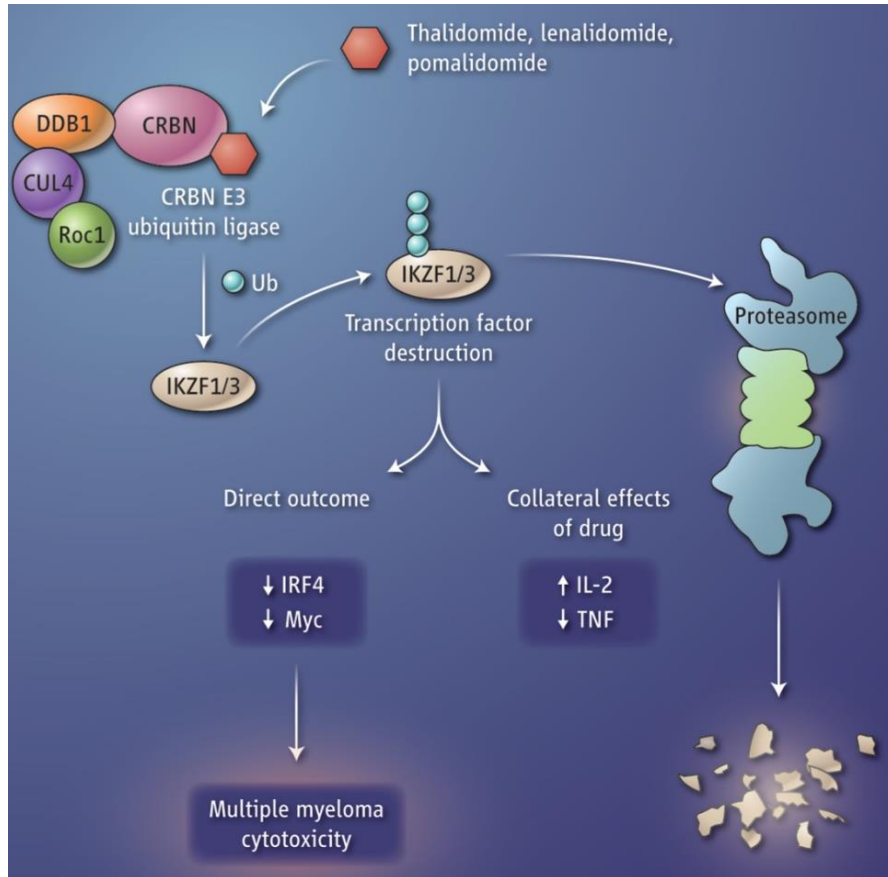


Figura 11 Mecanismo de acción de los agentes inmunomoduladores. Fuente Kronke et al, Science, 2014 y Lu et al, Science, 2014.

Estos fármacos son caros y presentan efectos secundarios graves, como leucocitosis, trombocitosis, que provocan la aparición de infecciones y grandes hematomas (114,115). Además, existen pacientes que muestran resistencia a su acción farmacológica por lo que actualmente se están llevando a cabo numerosos estudios para elucidar el mecanismo de resistencia a los IMiDs en pacientes con MM (110,111). Estas drogas se unen a la proteína Cereblon codificada por el gen *CRBN*. Esta proteína forma parte del complejo ubiquitina ligasa E3 (Figura 11). Se cree que Cereblon une al sustrato

en este complejo y junto con otras proteínas ubiquitinadoras induce la proteólisis. Se ha demostrado que la presencia de esta proteína es necesaria para la actividad farmacológica de estas drogas, encontrándose alto número de mutaciones y una baja expresión de este gen tanto en líneas como en pacientes de MM resistentes a estas drogas(116,117) .

Hoy en día, estos compuestos junto con los inhibidores de proteosoma forman el núcleo central de cualquier tratamiento anti-mieloma, contribuyendo enormemente a la mejora de la supervivencia de los pacientes.

1.6 Medicina personalizada

Hoy en día el concepto de que cada individuo es diferente y que responde de distinta manera ante el mismo tratamiento es algo asumido por todos. Ya en la época de la antigua Grecia se hablaba de que la medicina no era una materia absolutista e inflexible sino que el médico debía tomar decisiones sobre el tratamiento de cada paciente basándose en sus condiciones particulares como la edad, estado de salud, estilo de vida etc (118). Gracias al avance de la medicina y de las técnicas de screening genético el concepto de medicina personalizada ahora es mucho más profundo y es definido como: aproximación para el tratamiento y prevención de enfermedades que tiene en cuenta la variabilidad genética del cada individuo, así como su entorno y estilo de vida (119). La estratificación clásica de “una enfermedad un tratamiento” ha funcionado bien con muchas enfermedades y ha permitido alargar y salvar la vida de numerosos pacientes. Sin embargo, en el campo de la oncología se requiere de un conocimiento mucho más profundo y detallado de las peculiaridades biológicas individuales de cada paciente, de cada tumor, y de cada parte del tumor para establecer un tratamiento óptimo.

1.6.1 Medicina personalizada en cáncer

La oncología es una de las áreas donde más evidente ha sido el impacto de la aplicación de la medicina personalizada. Algunos tratamientos actuales, como la quimioterapia convencional, no se dirigen específicamente a las características genéticas o bioquímicas de la enfermedad del paciente.

Gracias al desarrollo de las técnicas moleculares de screening genético como la NGS es posible identificar las alteraciones genéticas presentes en el tumor de cada paciente y proporcionar a cada uno la terapia que proporcione una mayor probabilidad de éxito.

Un ejemplo claro fue la identificación del gen *HER2*, un receptor de estrógeno que se encuentra sobreexpresado en uno de cada cinco tumores de mama y que confería un pronóstico muy desfavorable a estas pacientes debido a la agresividad y rápida evolución de estos tumores. En 1980 se desarrolló *Trastuzumab*, un anticuerpo monoclonal que ataca específicamente a las células con sobreexpresión de *HER2* inhibiendo su proliferación y reduciendo en un 50% el riesgo relativo (120,121).

Otro ejemplo de notable repercusión fue la identificación de la sobreexpresión del gen *EGFR* en cáncer de pulmón. Este gen codifica una proteína receptora transmembrana con actividad tirosin cinasa cuya función es la de fosforilar y activar las vías de proliferación e invasión celular. Existen varios inhibidores de *EGFR* en la actualidad que se administran a pacientes con este tipo de alteración genética, como el Erlotinib, Afatinib, Gefitinib. Estos fármacos son anticuerpos monoclonales y han permitido mejorar el pronóstico de los pacientes de cáncer de pulmón de 12 a casi 30 meses (122–125).

Dentro del campo de la onco-hematología, la leucemia mieloide crónica es el paradigma de la medicina de precisión. El descubrimiento del cromosoma Philadelphia t(9;22) llevó

al desarrollo del Imatinib, una pequeña molécula que inhibe específicamente la activación constitutiva Bcr-abl tirosina cinasa y que permite controlar la enfermedad con unos resultados de supervivencia excelentes (126).

1.6.2 Medicina personalizada en el MM

El reciente desarrollo de las técnicas moleculares, en concreto la NGS, ha permitido saber que un alto porcentaje de los pacientes presentan mutaciones en genes como *KRAS*, *NRAS*, *DIS3*, *BRAF* o *TP53*. Esta información es muy valiosa ya que permitiría el diseño de fármacos que actuaran directamente sobre estas alteraciones, disminuyendo los efectos secundarios de las quimioterapias convencionales, aumentando la eficacia de los tratamientos y permitiendo la búsqueda personalizada del mejor tratamiento para cada paciente de acuerdo con su perfil genético. Por ejemplo, pacientes con mutaciones en el gen *KRAS* podrían beneficiarse de una terapia que incluyera un anticuerpo anti-EGFR, del mismo modo que pacientes con una alta expresión de *PD1* podrían beneficiarse de anticuerpo anti-PD1.

Sin embargo, esta no es la situación en la que hoy en día se presenta en el tratamiento del MM, dado que a pesar del gran número de fármacos que se encuentran disponibles en la actualidad, los resultados muestran que estas alteraciones no sensibilizan eficazmente a la acción farmacológica de las drogas. Esto se debe a varios factores:

El primero, y como ya se ha comentado anteriormente, existen un gran número de genes que se han encontrado alterados en pacientes de MM los cuales están implicados en multitud de rutas metabólicas y de señalización (55,127). Además, la recurrencia mutacional de estos genes es muy baja, siendo *KRAS* el más frecuente y encontrándose mutado en un 20% de los pacientes (127,128).

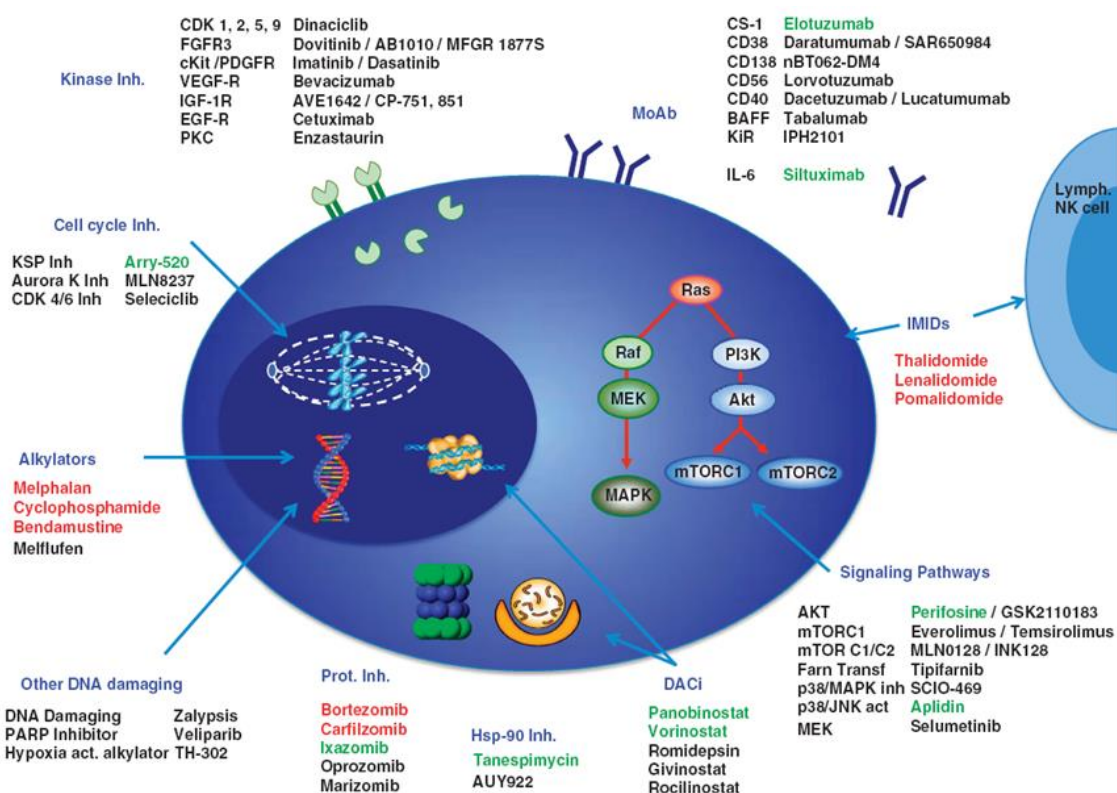


Figura 12 Representación esquemática de las principales dianas de las CP-MM y las drogas probadas contra ellas. Los fármacos aprobados se muestran en rojo y los que ya han superado la fase III de desarrollo en verde. EM Ocio et al. Leukemia (2014) 28, 525-542.

Segundo: la existencia de una evolución clonal de las CP-MM hace que en un mismo punto temporal existan perfiles genéticos diferentes y, por lo tanto, las mismas mutaciones no estén presentes en toda la extensión del tumor (55).

Tercero: en muchos casos estas mutaciones son silenciadas por los propios mecanismos celulares, de manera que no son observadas a nivel de ARN o proteína, y por tanto, no son susceptibles a la acción farmacológica de ninguna droga (129).

Por todo esto, a pesar de que conocer el perfil genético mutacional de los pacientes está siendo muy útil para entender los mecanismos celulares implicados en la enfermedad, a nivel pronóstico no han sido de gran ayuda. Las características genéticas de las CP-MM

hacen que las estrategias adoptadas para el tratamiento de otros tumores, como el de pulmón, no puedan aplicarse y, por tanto, en la actualidad la selección del tratamiento más adecuado para cada paciente no se hace en base a la firma molecular del tumor. Estas limitaciones han generado estrategias más integradoras como la biología de sistemas, que intentan integrar diversos datos para caracterizar un sistema como es la célula tumoral, su entorno, y la acción de fármacos sobre ella

Por este motivo, cada vez son más los estudios enfocados a la predicción de la respuesta al tratamiento mediante ensayos ex vivo basados en el fenotipo más que en el genotipo de los pacientes (130–132). En los últimos 40 años se han desarrollado varios ensayos con el fin de predecir la respuesta al tratamiento de los pacientes estudiando la acción de los fármacos sobre las células aisladas de los pacientes mediante CFM.

1.6.3 Estrategia de medicina personalizada alternativa a los estudios moleculares: Test ex vivo de sensibilidad a fármacos.

La técnica más comúnmente empleada en la evaluación ex vivo de la actividad antitumoral es la citometría de flujo multiparamétrica. Esta técnica se ha empleado ampliamente en números aspectos del desarrollo preclínico de fármacos, desde la selección de una diana terapéutica celular hasta la identificación y validación de mecanismos de acción farmacológica. Existen ensayos de quimiosensibilidad muy estandarizados, como por ejemplo la calorimetría semi automática con MTT o los ensayos de bioluminiscencia, que permiten capturar la acción farmacológica sobre una población entera de células. La CFM en cambio lleva a cabo un análisis individual de cada célula permitiendo la detección selectiva del efecto de un fármaco sobre una población celular en particular, y sobre muchas poblaciones simultáneamente. Esto permite estudiar la actividad citotóxica de un fármaco sobre una población en concreto,

como podrían ser las células tumorales, contando el número de células que sobreviven tras la exposición a dosis crecientes del fármaco durante un tiempo determinado y, al mismo tiempo, evaluar su toxicidad sobre el resto de las células sanas y estimar posibles efectos secundarios. Sin embargo, la CFM aplicada al screening de fármacos se ve muy limitada debido al pequeño número de ensayos que pueden ser llevados a cabo en una sola muestra de paciente y por la baja automatización.

El MM podría considerarse como una población heterogénea de células tumorales las cuales presentan niveles diferentes de sensibilidad a los tratamientos. A diferencia de células normales donde normalmente se observaría una respuesta homogénea a la acción de un fármaco, en las células tumorales encontramos algunas fácilmente eliminables mientras que otras se muestran totalmente resistentes (133,134). Esto generalmente se combate empleando una combinación de fármacos estructural y funcionalmente diferentes que permita abordar a las células tumorales desde diferentes efectos y mecanismos de acción. Esta resistencia puede ser adquirida o *de novo* (135). La resistencia adquirida se desarrolla gradualmente como resultado de la adquisición de cambio genéticos y epigenéticos que eventualmente confieren al tumor un complejo fenotipo resistente. Esta resistencia se estudia *in vitro* y en ella intervienen numerosos procesos como por ejemplo la absorción del fármaco, la expresión de nuevas vías de expulsión del fármaco, el metabolismo celular, alteraciones en la proliferación y apoptosis etc. Sin embargo, la resistencia *de novo* es aquella mediada por el microambiente de la MO que protege a las células tumorales de la acción quimioterapéutica, radioterápica o dirigida de los fármacos.

Por otro lado, cada vez más estudios apuntan a que el microambiente del tumor juega un papel fundamental en la patogénesis y crecimiento de las células cancerosas y por

tanto debe ser tenido en cuenta en la evaluación del efecto farmacológico (136,130,137,131). Existe una comunicación cruzada entre las células tumorales y las células del microambiente de la MO que provoca que, durante el tratamiento, una población de células se encuentre en un estado protegido de quiescencia y, finalmente, esto resulte en una enfermedad mínima residual que progresivamente evoluciona a un fenotipo resistente. Los elementos fundamentales en este tipo de resistencia son los factores solubles y las moléculas de adhesión (138). El factor de crecimiento y supervivencia de mayor importancia e impacto en el MM es la IL-6 y la molécula de adhesión por excelencia son las B integrinas. Sin embargo otras citosinas como HGF (139) y IGF-1 (140) también están implicadas en la resistencia a fármacos. Por ejemplo, resistencia *de novo* al Bortezomib se ha observado en pacientes con la cascada de señalización IGF-1/IGF-1R activada y se ha asociado con altos niveles de la citocina IGF-1, hallazgos que también han sido observados en procesos de resistencia adquirida al Bortezomib (141).

Cuando se trata de evaluar la respuesta farmacológica, no puede despreciarse el impacto que los componentes del microambiente de MO tienen en la patogénesis o el crecimiento del tumor y, por supuesto, en la resistencia o sensibilidad a fármacos (142). Su papel se ha convertido incluso más significativo con el descubrimiento y desarrollo de drogas específicamente dirigidas a estos componentes (143). El fracaso de numerosos estudios *in vitro* que pretendían explicar el comportamiento farmacológico observado en los pacientes se debe en gran medida a la exclusión de este componente del ensayo. Las células estromales, plaquetas, plasma y la serie roja influyen en la eficacia de muchos fármacos, y es crítico que ensayos *in vitro* incluyan estos

componentes para obtener resultados predictivos, fiables y reproducibles (132,144,145).

El estudio de la actividad ex vivo de una droga además de obligar a controlar factores biológicos, técnicos y experimentales, conlleva una serie de limitaciones analíticas en cuanto al modelado de la respuesta obtenida tras la incubación de las células tumorales con concentraciones crecientes del fármaco.

➤ **Modelado farmacodinámico**

La reciente introducción del modelado poblacional de efectos mixtos revolucionó la industria farmacéutica ya que permitió solventar el mayor problema que presentaba este tipo de aproximación: la enorme variabilidad en la respuesta farmacológica interindividuo (146,147). Con la antigua metodología se obtenía una variabilidad interindividuo que parecía inexplicable y que se abordaba aumentando el número de individuos y buscando poblaciones muy homogéneas. Esto, además de aumentar muchísimo el coste de los ensayos, no proporcionó resultados satisfactorios en grupos de individuos que no cumplían las estrictas características clínicas y biológicas. Los modelos poblacionales actuales proporcionan estimaciones cuantitativas de la variabilidad interindividual, describiendo la relación cuantitativa que existe entre una concentración de droga y la magnitud de su efecto en un determinado tejido. Además, permiten la introducción de características específicas de cada paciente para construir un modelo poblacional más completo y fiel (148).

En un primer paso, se lleva a cabo la modelización simultánea del comportamiento del fármaco en una determinada población y se cuantifica la variabilidad en la respuesta farmacológica entre pacientes, permitiendo su diferenciación de los errores residuales asociados al proceso experimental (efectos mixtos). Después, se lleva a cabo un estudio

de covariables con el objetivo de identificar cuáles de ellas explican en mayor grado la variabilidad inter paciente observada, y por tanto, la sensibilidad o resistencia a un fármaco (149).

El modelo farmacodinámico más ampliamente utilizado es el llamado modelo de Emax sigmoide, más flexible que el modelo Emax lineal y basado en la ecuación de Hills que asume que el efecto del fármaco (E) es directamente proporcional a la ocupación de su receptor (150,151). El objetivo del modelado poblacional es la estimación de los parámetros poblacionales farmacodinámicos: E_0 , E_{max} , EC_{50} y γ y la cuantificación de la variabilidad observada entre pacientes, pudiendo determinar cuánta de esta variabilidad se debe a factores biológicos y cuánta a errores residuales bien de la parte experimental o bien del ajuste del propio modelo.

En la Figura 13 se muestra la ecuación empleada en la construcción del modelo donde E_0 corresponde al efecto observado a concentración cero del fármaco, E_{max} al efecto máximo del fármaco y se relaciona con la eficacia, EC_{50} a la concentración de fármaco que provoca un efecto del 50% y se relaciona con la potencia y γ que corresponde a la pendiente del tramo lineal de la curva sigmoide de dosis-respuesta.

NONMEM es el software por excelencia empleado para el modelado de efectos mixtos poblacional en la industria farmacéutica, tanto para estudios farmacocinéticos como farmacodinámicos (PK/ PD) (152,153). Su nombre procede del acrónimo NON-linear Mixed Effects Modeling y fue desarrollado por la UCSF en 1979 (154). Utiliza métodos bayesianos y de máxima verosimilitud para llevar a cabo los ajustes y la obtención de los parámetros (152,154). Este programa se ejecuta por línea de comandos usando sintaxis NM-TRAN, derivada de Fortran.

$$E = E_0 \times \left[1 - E_{MAX} \times \frac{C_{50}^{\gamma}}{C + EC_{50}^{\gamma}} \right]$$

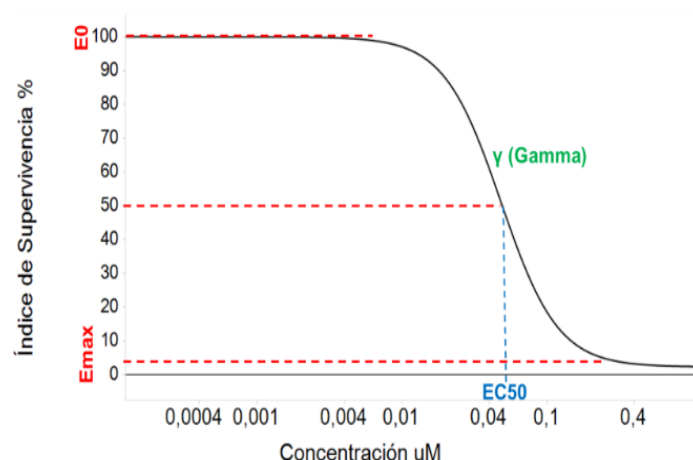


Figura 13 : Ecuación de Emax sigmoide basada en la ecuación de Hills. Abajo, la curva típica de dosis respuesta a la que da lugar.

NONMEM desarrolla el modelado empleando un método de estimación condicional de primer orden (First-order conditional estimation FOCE) analizando el logaritmo del número de células patológicas vivas a unos determinados valores de concentración del fármaco. Calcula la variabilidad residual, que es aquella cuyo origen se debe a errores en las determinaciones experimentales o en la estimación del modelo y la diferencia de la variabilidad entre pacientes. Una variabilidad residual baja significa que el modelo describe el comportamiento farmacodinámico observado con mayor precisión.

El modelado basado en efectos mixtos no lineales ha demostrado ser extremadamente útil en farmacometría, tanto en el desarrollo de nuevos fármacos como para la mejora de tratamientos con compuestos ya aprobados (155,156) al permitir una estimación precisa de los parámetros farmacodinámicos poblacionales e individuales.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El MM es una neoplasia hematológica que aparece como consecuencia de una proliferación descontrolada de células plasmáticas en la MO. Se caracteriza por una gran heterogeneidad genética y un variable rango de respuestas clínicas a los tratamientos. El reciente desarrollo de nuevas terapias como los inhibidores de proteosoma o los agentes inmunomoduladores (IMiDs) ha permitido aumentar las opciones terapéuticas y mejorar considerablemente las expectativas de vida de estos pacientes. Sin embargo, la marcada variabilidad en la respuesta clínica a estos tratamientos pone de manifiesto que aún existe la necesidad de identificar nuevos factores pronóstico y marcadores de respuesta.

Actualmente, las alteraciones en el ADN son identificadas por estudio citogenético convencional u otras técnicas más modernas como la hibridación fluorescente in situ (*FISH*) en la mayoría de los hospitales. Sin embargo, el valor pronóstico que presentan es limitado y tras la incorporación de nuevas terapias necesita ser reevaluado. La reciente aparición de la secuenciación de nueva generación o NGS (del inglés *Next Generation Sequencing*) ha aumentado considerablemente nuestro conocimiento acerca de las características biológicas y genéticas de las células del MM. En los últimos años varios grupos han publicado trabajos en los que se empleaban las técnicas de secuenciación masiva más novedosas, como la secuenciación de genoma o exoma completo y también la secuenciación dirigida de genes implicados en procesos patofisiológicos y en mecanismos de acción farmacológica. Gracias a estos trabajos se ha podido confirmar el impacto de algunas de las alteraciones genéticas detectadas a nivel pronóstico, incluso cuando estas se encontraban de manera subclonal en una

población muy pequeña células plasmáticas. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos que se han realizado para estratificar a los pacientes y predecir su respuesta al tratamiento, no existe una clara relación entre la presencia de mutaciones y la sensibilidad a los fármacos, por lo que su tratamiento aún no se decide basándose en el perfil genético del tumor sino más bien en la pericia clínica del médico.

Además de las alteraciones genéticas a nivel de ADN nuclear, cada vez son más las evidencias de que existe una alteración del metabolismo energético de las células tumorales que implican mutaciones y cambios en el contenido de ADN mitocondrial. Estudios recientes en otros tumores han señalado que las alteraciones mitocondriales juegan un papel muy relevante en el pronóstico y respuesta al tratamiento, pero hasta la fecha no hay nada descrito acerca de este papel en el MM.

Por otro lado, debido al limitado potencial de la información genética como predictor pronóstico o de respuesta al tratamiento de los pacientes, están emergiendo otras estrategias alternativas. Una de las más interesantes y que mejores resultados está reportando consiste en la predicción de la respuesta clínica de los pacientes a partir de ensayos in vitro, donde se estudia la actividad farmacológica de la droga en muestras de pacientes. Esta aproximación se está postulando como una excelente alternativa para predecir la respuesta clínica de los pacientes y establecer el esquema de tratamiento más adecuado que minimice los efectos adversos y la toxicidad. Vivia Biotech ha estado desarrollando una novedosa tecnología basada en citometría de flujo multiparamétrica y modelado farmacodinámico poblacional que permite, además de una total automatización y reproducibilidad, minimizar la variabilidad técnica inter-individuo. Además, su tecnología permite el uso de la muestra completa del paciente, reproduciendo el microambiente nativo del tumor de una manera más precisa y

proporcionando resultados de sensibilidad a drogas más realistas. La capacidad de esta tecnología ya ha sido validada en pacientes con leucemia mieloide aguda, donde se ha demostrado una capacidad de predicción de la respuesta clínica a Citarabina e Idarubicina del 85%. El magnífico resultado ha motivado su extensión a otros tratamientos y patologías, como el MM, el cual es objeto de desarrollo en esta tesis doctoral.

Por lo tanto, el desarrollo de estrategias de screening genético y farmacológico podría ser una combinación ideal para lograr un manejo personalizado del paciente, y así proporcionar “el tratamiento adecuado, a la persona adecuada en el momento adecuado”.

Objetivos:

- 1.- Desarrollo y aplicación de una estrategia basada en la secuenciación profunda dirigida mediante NGS para explorar el perfil mutacional de pacientes con MM e identificar factores pronósticos y biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento.
- 2.- Evaluación del ADN mitocondrial en células de mieloma mediante distintas metodologías y determinar por primera vez su implicación en la progresión de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento.
- 3.- Construcción de modelos farmacodinámicos de las drogas más comúnmente empleadas en el tratamiento MM a partir de datos de sensibilidad ex vivo obtenidos por citometría de flujo multiparamétrica.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN NUCLEAR

❖ *Estudio del ADN nuclear mediante secuenciación masiva paralela.*

3.1.1 *Pacientes y muestras*

Se secuenció el DNA procedente de las células plasmáticas tumorales de 79 pacientes con MM de nuevo diagnóstico incluidos en el ensayo clínico GEM10MAS65 (registrado en www.clinicaltrials.gov como #NCT01237249)(157). Brevemente, este ensayo clínico en fase II incluía pacientes mayores de 65 años, no candidatos a trasplante autólogo y sin enfermedades secundarias. Los pacientes fueron asignados de manera aleatoria a recibir Bortezomib + Melfalán + Prednisona (VMP) seguido de Lenalidomida + Dexametasona a bajas dosis (Rd), siguiendo dos esquemas de administración distintos: alternante, donde un ciclo de VMP se alternaba con otro de Rd; o secuencial, donde se administraban 9 ciclos de VMP seguidos de 9 ciclos de Rd.

3.1.2 *Purificación y extracción del ADN*

En un primer lugar, se procedió al lisado de los aspirados de MO eliminando la fracción eritrocítica y separando la fracción de células mononucleadas. Después se procedió a la purificación de las células plasmáticas mediante el empleo de bolas inmunomagnéticas marcadas con el anticuerpo CD138 según las instrucciones de la casa comercial (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La pureza de la fracción CD138+ fue en todos los casos superior al 85%. El ADN fue extraído empleando el kit de Qiagen AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y su cuantificación se

realizó por medición fluorimétrica empleando el kit comercial Qubit™ (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies).

3.1.3 Construcción de librerías:

Lo primers empleados para la selección de las regiones de ADN a estudiar fueron proporcionados por la Clínica Mayo de Arizona. Este panel (M3P) contiene los 77 genes más frecuentemente alterados en MM, con una recurrencia mutacional por encima del 2% de los pacientes (Tabla 3). Estos genes están implicados con rutas patofisiológicas del MM, están relacionados con resistencia a fármacos o son diana de alguno de los tratamientos más empleados en MM, tanto de manera individual como en su ruta metabólica.

ACTG1	CSNK2A1	IKZF3	PRDM1	TNFRSF13B
ATM	CUL4A	IL6	PSMA1	TNFRSF21
B2M	CUL4B	IL6R	PSMB5	TNFSF9
BAGE2	CXCR4	IL6ST	PSMB8	TP53
BIRC2	CYLD	IRF4	PSMB9	TRAF2
BIRC3	DIS3	JAK2	PSMD1	TRAF3
BRAF	EGFR	KDM6A	PTPN11	TRAF3IP1
CARD11	EGR1	KRAS	RASA2	WHSC1
CCNB1	FAM46C	MAF	RB1	XBP1
CCND1	FGFR3	MAFB	RIPK1	
CCNT1	GRB2	MAP3K14	RIPK4	
CDK4	IDH1	MAX	SHC1	
CDK7	IDH2	MYC	SP140	
CDKN1B	IDH3A	MYD88	SRF	
CDKN2A	IFNGR2	NFKB1B	STAT3	
CDKN2C	IGF1R	NR3C1	TGFBR2	
CRBN	IKZF1	NRAS	TLR4	

Tabla 3 Genes incluidos en el panel M3P de la Clínica Mayo.

Este panel se dividió en dos pools de primers correctamente divididos para minimizar posibles interferencias en el proceso de amplificación. Para la generación de las librerías

se empleó el kit Ampliseq Library Kit 2.0 (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

Este protocolo consiste en 3 pasos bien diferenciados (Figura 14):

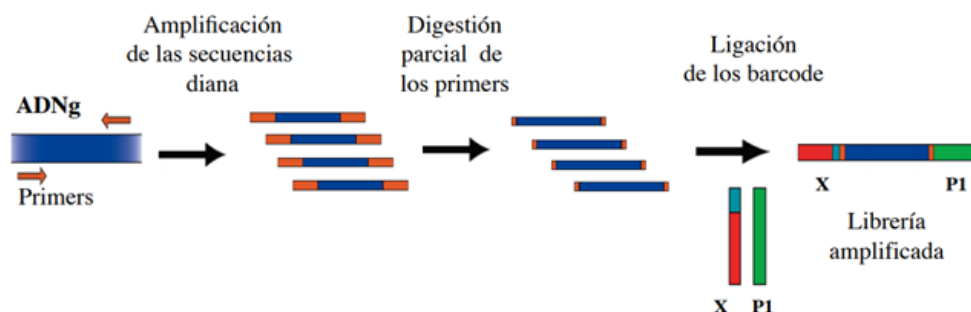


Figura 14 Representación esquemática de los pasos realizados en la construcción de la librería Ampliseq.

➤ 1.- Amplificación de las regiones de interés.

Para cada muestra se empleó 10ug de ADN por pool de primers y se añadió los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de las regiones de interés, empleando los reactivos y las cantidades indicados en la Tabla 4. La PCR se llevó a cabo en el termociclador Veriti 96 well Thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) aplicando el programa detallado en la Tabla 5.

Reactivos	Volumen (μl)
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	2
DNA (10ng/μL)	1.5
Agua libre de DNAsas	1.5
Grupo de cebadores	5
Volumen Total	10

Tabla 4 Mezcla de reacción para la amplificación de las regiones genéticas de interés.

Condiciones/Etapas		Tiempo	Temperatura
Activación de la enzima		2 min	99 °C
PCR (18 ciclos)	Desnaturalización	15 s	99 °C
	Alineamiento / Elongación	4 min	60 °C

Tabla 5 Programa del termociclador para llevar a cabo la amplificación.

➤ 2.- Digestión parcial de los primers

Los productos resultantes de la amplificación anterior se juntaron y se añadió 1 uL de FUPA, un reactivo que digiere los primers sobrantes. El programa del termociclador se detalla en la Tabla 6.

Etapas	Tiempo	Temperatura
1	10 min	50 °C
2	10 min	55 °C
3	20 min	60 °C

Tabla 6 Programa del termociclador para llevar a cabo la digestión de los primers.

➤ 3.- Ligación de los adaptadores de secuenciación

En esta etapa se llevó a cabo la unión, primero de los adaptadores y segundo de los identificadores, a los fragmentos de ADN amplificados, lo cual permite la secuenciación simultánea de muestras en un mismo chip de secuenciación. Se llevó a cabo en el mismo termociclador que en las etapas anteriores.

Reactivos	Volumen (μL)	Etapas	Tiempo	Temperatura
Ion P1 Adapter	2			
Ion Xpress™ Barcode X	2	1	30 min	22 °C
Agua libre de DNAsas	4			
Total	8	2	10 min	72 °C

Tabla 7 Mezcla de reacción para la ligación de los adaptadores requeridos para llevar a cabo la posterior secuenciación de los amplicones generados. A la derecha el programa del termociclador.

Reactivos	Volumen (μL)	Etapas	Tiempo	Temperatura
Switch Solution	2	1	30 min	22 °C
Ion Code dapters	1	2	5 min	68°C
DNA Ligasa	1	3	5 min	72 °C
Total	4	4	Hasta 24h	10°C

Tabla 8 Mezcla de reacción para llevar a cabo la ligación de los barcodes o identificadores de cada muestra. A la derecha las condiciones del programa del termociclador.

➤ 4.- Purificación de la librería

Para la purificación de las librerías se empleó el reactivo *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* (Life technologies). Este reactivo está formado por bolas magnéticas que se unen a los amplicones de las librerías de manera específica. Se añadió un volumen de *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* igual a 1.5 veces al volumen del producto de reacción del paso anterior y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se empleó un imán para poder lavar las bolas unidas a las librerías con etanol al 70%. Después de realizar los lavados se dejaron secar las bolas para luego eluir las librerías en 25 μL de Low TE (Life technologies).

➤ 5.- Cuantificación de la librería

La cuantificación se realizó mediante una Real Time PCR empleando el termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) y el *kit Ion Library TaqMan® Quantitation* (Tabla 9).

Primeramente, se realizó una dilución 1/1000 de los productos obtenidos en los pasos anteriores y se prepararon las diluciones con sus reactivos en placas de 96 pocillos añadiendo cada muestra por triplicado. Finalmente, las librerías se llevaron a una concentración final de 100pM y se guardaron a -20ª hasta el día de la secuenciación.

Reactivos		Volumen (µl/muestra)
2X TaqMan® MasterMix		5.5
20X Ion TaqMan® Assay		0.5
Librería		4.5

Etapas		Tiempo	Temperatura
Activación de la enzima		2 min	50 °C
Activación de la enzima		10 min	95 °C
PCR (40 ciclos)	Desnaturalización	15 s	95°C
	Alineamiento / Elongación	1 min	60 °C

Tabla 9 Mezcla de reacción para la cuantificación de la cantidad de librería generada. Abajo las condiciones de la RT-PCR.

3.1.4 PCR de emulsión

Como en todas las plataformas de secuenciación, para poder llevar a cabo la secuenciación de los fragmentos de ADN seleccionados es necesario que estos se encuentren en cantidades mucho mayores para proporcionar una señal mínima cuantificable. Para ello es necesario realizar una amplificación de las librerías generadas,

que, en este caso, se realizó por PCR de emulsión al emplear la plataforma de secuenciación Ion Torrent (Figura 15).

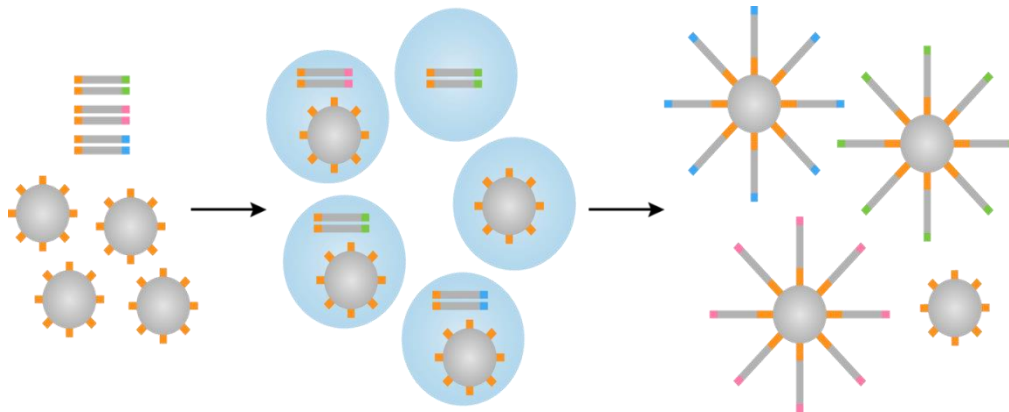


Figura 15 Esquema de las etapas de un PCR de emulsión. Fuente atdbio.

La PCR de emulsión se llevó a cabo en un *Ion One Touch 2* siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Primero se introdujeron los amplicones generados en la construcción de librerías, los reactivos de PCR y el aceite de emulsión.

El fenómeno que sucede en el interior es una amplificación masiva y paralela de cada amplicón generado en la construcción de la librería. El aceite en contacto con el medio acuoso produce la formación de millones de microreactores donde en cada uno de ellos se introduce una esfera magnética pegada a único amplicón que gracias a los reactivos de PCR se amplifica específicamente miles de veces. Después mediante centrifugación se recogen las microesferas y se liberan los fragmentos en un medio acuoso adecuado para llevar a cabo la secuenciación.

3.1.5 Secuenciación

La secuenciación de la plataforma Ion Torrent está basada en la detección de protones que son liberados tras la unión de cada nucleótido, de manera que se lleva a cabo midiendo las variaciones de pH producidas tras la adición de cada nucleótido a cada

micropocillo del microchip. El producto resultante de la amplificación clonal se inyecta en un chip de secuenciación siguiendo el protocolo del fabricante. Durante la secuenciación, cada base nitrogenada del ADN amplificado será leído un promedio de 1600 veces, por lo que el número de lecturas por muestra supera los 2 millones.

3.1.6 Análisis bioinformático

El análisis primario y secundario de los datos resultantes de estudios de NGS supone el mayor desafío en la actualidad, ya que consiste en una multitud de pasos conectados que requieren del empleo de herramientas bioinformáticas que, en muchos casos, aún no están optimizadas. Por este motivo, en este trabajo todas las muestras han sido analizadas mediante dos pipelines bioinformáticos distintos: uno más standard proporcionado por la propia casa comercial Ion Torrent, y otro más flexible y potente desarrollado por el grupo de bioinformática del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas llamado RubioSeq. En ambos casos, los pasos a seguir se detallan en la Figura 16.

➤ Control de calidad

En este paso las lecturas procedentes del secuenciador Ion Proton son evaluadas por un software integrado en el secuenciador llamado *Torren Suit*. Este software evalúa las calidades de las lecturas obtenidas y elimina aquellas con un valor por debajo del 15, lo cual significa que descarta lecturas en las que la probabilidad de encontrar un error por cada 100 pares de bases sea superior al 1%. RubioSeq utiliza el programa FastQC con el mismo objetivo.

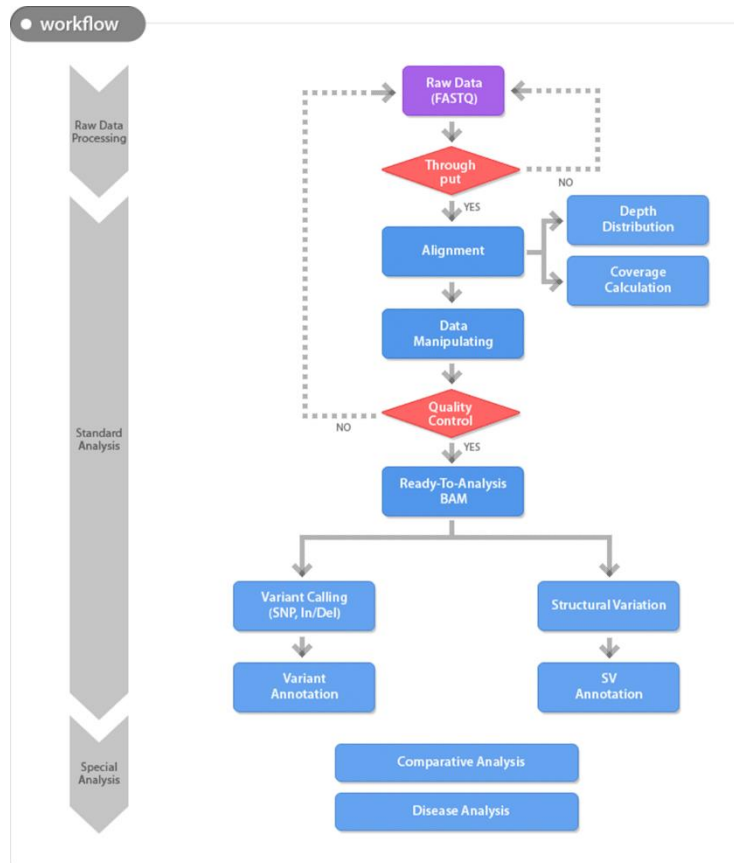


Figura 16 Flujo de trabajo llevado a cabo en el análisis de secuencias genéticas obtenidas por NGS.

➤ Alineamiento

En este paso, todas las lecturas secuenciadas se mapean frente al genoma de referencia humano hg19. Los dos pipelines emplean el mismo programa bioinformático llamado BWA. Este proceso genera un archivo de lecturas alineadas con extensión .bam. También es necesario eliminar las secuencias duplicadas como consecuencia del empleo de PCR en el proceso de construcción de librerías. Esto se llevó a cabo en ambos pipelines con el programa PicardTools.

➤ Identificación de las variantes

En este paso se analiza la lectura de la secuencia en la muestra y se compara con la del genoma de referencia. Serán reportadas como variantes alélicas todas las bases

discordantes entre la muestra y el genoma de referencia. Tanto la base como la posición son recogidas en un archivo con extensión .vcf donde además también se incluye información acerca de la calidad de la base etc. Para llevar a cabo este paso existen multitud de algoritmos. El empleado en este trabajo tanto por el software de Ion Torrent como por el del CNIO fue *GATK*.

➤ **Anotación de las variantes**

El proceso de anotación consiste en recoger información sobre las variantes detectadas en la etapa anterior a través de consultas en base de datos de diversa índole.

Tanto el software de Ion Torrent como el del CNIO consultan bases de datos muy similares. Algunas de las más importantes e informativas son:

- *SIFT Y Polyphen-2*: predictores de patogenicidad que estudian el impacto estructural y funcional del cambio de aminoácido en la proteína.
- *COSMIC* (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer): es la base de datos más complete del mundo que recoge información sobre el impacto de variantes somáticas detectadas en cánceres humanos.
- *dbSNP* (Database of Short Genetic Variation): base de datos que recoge variantes genéticas a lo largo de numerosas especies. Generalmente se trata de polimorfismos encontrados en la población.
- *1000 Genomes*: base de datos que contiene integradas variantes genéticas detectadas en el proyecto 1000 Genomas, el cual combina información de cerca de 2500 individuos, o bien genoma completo a baja cobertura o secuenciación de exoma.

- *ExAC o Exome Aggregation Consortium*: contiene datos genéticos de más de 60 mil individuos correspondientes a varios proyectos de investigación mundiales.
- ClinVar: contiene información sobre variaciones genéticas asociadas con algún tipo de enfermedad humana.

➤ **Filtrado de variantes**

Debido al grandísimo número de variantes encontradas por muestra, fue necesario un riguroso y complejo proceso de selección de variantes. Los criterios de filtrado de variantes fueron los mismos para los dos pipelines bioinformáticos utilizados:

Se descartaron variantes que:

- 1.- Estuvieran localizadas en zonas intrónicas.
- 2.- Que no dieran lugar a cambio de aminoácido (sinónimas).
- 3.- Que tuvieran una cobertura inferior a 20X.
- 4.- Presentes en la base de datos de mutaciones puntuales no patogénicas como dbSNP, ExAc, 1000 Genome etc, con una frecuencia alélica minoritaria por encima del 1% de la población.
- 5.- Una vez eliminadas todas estas variantes, se revisaron una por una en el visualizador de genomas IGV (Integrative Genomic Viewer) con el fin de identificar errores de secuenciación debido a localizarse en regiones homopolímeras del genoma, donde la tecnología Ion Torrent no puede detectar variantes con la precisión adecuada.
- 6.- También se eliminaron aquellas variantes que sistemáticamente estuvieran presentes en todas las muestras, tanto en las tumorales como en las sanas, a una frecuencia alélica similar.

Para la evaluación del criterio de filtro empleado, se secuencio tejido sano de 11 pacientes y se confirmó que ninguna variante germinal pasaba los estrictos criterios de filtros establecidos. Aunque no se puede descartar la inclusión de variantes germinales en la cohorte final de mutaciones, se espera una proporción muy baja de las mismas.

➤ **Validación de variantes**

Todas las variantes que fueron detectadas a valores de FA inferiores al 10% fueron validadas por doble secuenciación de la muestra, partiendo de una nueva alícuota de ADN y repitiendo todos los pasos detallados en los apartados anteriores.

3.1.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software libre R (version 3.3.1) y con Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, San Diego, CA, USA). La supervivencia libre de progresión (SLP) fue calculada desde el momento en el que se inició del tratamiento hasta la recaída o muerte de paciente, cualquiera que fuera la causa. La supervivencia global fue estimada desde el inicio del tratamiento hasta la muerte del paciente. El análisis de supervivencia se llevó a cabo mediante curvas Kaplan-Meier usando el modelo de regresión de Cox. También se realizó un análisis de supervivencia multivariado usando el modelo de regresión de Cox. Para la selección de las variables que debían formar parte del modelo estadístico se empleó el *Criterio de Información de Akaike* (AIC) (158). Los coeficientes de correlación entre variables genéticas y mutaciones fueron calculados y visualizados usando la función `corrplot` de R (<https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/>).

3.2 ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN MITOCONDRIAL

- ❖ **Estudio del estado del ADNmt en los diferentes estadios del MM y su empleo como biomarcador de progresión y pronóstico.**

3.2.1 Estimación NC de ADNmt por PCR cuantitativa a tiempo real.

Se analizaron las células plasmáticas purificadas CD138+ pertenecientes a 139 pacientes; 4 pacientes sanos, 16 con GMSI, 14 con SMM, 78 MM de nuevo diagnóstico (MMnd) y 24 con MM en recaída (MMr).

➤ Purificación de CP y extracción de ADN

La purificación de células plasmática a partir de aspirados de MO, así como la extracción y cuantificación del ADN nuclear se realizó siguiendo las mismas indicaciones que se han descrito en el apartado “3.1.2 Purificación y extracción del ADN”.

➤ Curva de calibración para la estimación del NC de ADNmt

Para la estimación del NC de ADNmt se empleó una curva patrón construida a partir de dos plásmidos, uno con un inserto mitocondrial (122 pb, nt805-nt927) y otra con un inserto nuclear (87 pb de la RNAsa P). Los amplicones de la PCR se clonaron en un vector plásmido con el kit *TOPO® TA Cloning® Kit* (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. La identidad de los insertos se confirmó mediante secuenciación directa. A partir de los clones seleccionados, previa amplificación, se extrajo su ADN y se cuantificó. Estos fragmentos de ADN se emplearon como calibrador, permitiendo el cálculo del NC de ADNmt y ADNn dividiendo su concentración entre el peso molecular de cada molécula del plásmido.

Después se llevaron a cabo diluciones estándar de este calibrador ($N/3 \times 7$) obteniendo así una curva de calibrado de 8 puntos (Tabla 10).

Calibrador	μL de calibrador	μL de HCL 10 mM pH=8.5	12S (ADNmt)	RNAse P (ADNn)
N	10	20	90000000	900000
N x 1/3	10	20	30000000	300000
N x 1/9	10	20	10000000	100000
N x 1/27	10	20	3333333	33333
N x 1/81	10	20	1111111	11111
N x 1/243	10	20	370370	3704
N x 1/486	10	20	185185	1851

Tabla 10 Condiciones de preparación de la curva estándar de calibración para la estimación del Número de copias de ADNmt

➤ Cuantificación del ADN mediante RT-PCR

Para la amplificación del ADNmt se empleó la sonda TaqMan ribosomal 12S (6FAM-5'-TGCCAGCCACCGCG-3', Applied Biosystems™) y los primers 12S forward mtF805-New (5'-CCACGGGAAACACGACTGAT-3') y 12S reverse mtR927 (5'-CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA-3'). Para la amplificación del ADNn se empleó el kit comercial *TaqMan RNaseP Control Reaction Kit* (Applied Biosystems™), marcada internamente con el fluoróforo VIC. -La master mix empleada en la PCR a Tiempo Real (RT-PCR) fue la *FG TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems™). La RT-PCR se llevó a cabo en el termociclador *LightCycler 480* (Roche Life Science) siguiendo las condiciones detalladas en la Tabla 11. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

Reactivos	Volumen (μL)			
Master Mix 2X	10			
Primer 12S F 5 μM	0.5			
Primer 12S R 5 μM	0.5			
Sonda 12S 5 μM	0.5			
Kit RNAsa P 20X	1			
Agua	2.5			
Muestra ADN	5			
		Etapa	Tiempo	Temperatura
		1	2 min	50 $^{\circ}\text{C}$
		2	10 min	95 $^{\circ}\text{C}$
		3 x 45 ciclos	15 s	95 $^{\circ}\text{C}$
			60 s	60 $^{\circ}\text{C}$

Tabla 11 Mezcla de reacción para la cuantificación del número de copias de ADN mt (izquierda). Programa del termociclador para llevar a cabo la RT-PCR (derecha)

El cálculo del NC de ADNmt/ADNn se realizó para cada uno de los pocillos, y después se calculó la media de las tres réplicas.

3.2.2 Estimación NC ADNmt a partir de secuenciación de exoma y genoma completo

➤ Muestras:

Se analizaron los cambios en el número de copias de ADNmt en muestras pareadas de 10 pacientes (20 muestras) correspondientes a la progresión de MMq a MM sintomático a partir de los datos de secuenciación de genoma completo (WGS) de las CP-MM purificadas. También se analizaron los cambios en el NC del ADNmt en muestras pareadas de 21 pacientes (43 muestras) correspondientes a 2 o 3 progresiones consecutivas del mismo paciente a partir de datos de secuenciación de exoma completo (WES). Ambos sets de datos fueron proporcionados por el grupo del Dr. Peter Campbell del Sanger Institute (Cambridge, UK) y por el grupo del Dr. Nikhil Munshi del Dana Farber Cancer Institute (Boston, MA, USA) y analizados durante la estancia en el departamento

de Biología Computacional del Hospital Dana Farber en Boston (MA, EE. UU.) bajo la supervisión de Dr. Nikhil Munshi y del Dr. Mehmet Samur.

➤ **Cálculo del NC de ADNmt:**

Los datos de secuenciación empleados en esta tesis son los archivos .bam que contenían las lecturas ya alineadas a los dos genomas de referencia pertinentes: Hg19 para el ADNn y Cambridge Reference Sequence para el ADNmt.

Existen varias estrategias previamente descritas para el cálculo de NC de ADNmt a partir de datos de secuenciación masiva, que han mostrado resultados comparables con métodos de cuantificación clásicos como la RT-PCR (159–161). En este trabajo el NC de ADNmt fue calculado usando dos aproximaciones bioinformáticas distintas:

1.- El programa *FastmitoCalc*, desarrollado por el grupo de Jun Din (Baltimore, MD, USA) (162). Este programa estima el NC de ADNmt directamente de datos de WES y WGS, basándose en la premisa confirmada por estudios previos de que la cobertura de secuenciación promedio del ADNn y el ADNmt es proporcional (159–161).

$$mtDNA \text{ copy number} = \frac{mtDNA \text{ average coverage}}{\text{autosomal DNA average coverage}} \times 2$$

Ecuación 1 Fórmula matemática empleada por el programa FastmitoCalc para la estimación del número de copias de AND mitocondrial a partir de los datos de cobertura promedio.

En un primer lugar, el programa calcula la cobertura promedio del genoma o exoma nuclear y mitocondrial completo a partir de archivo bam alineado. Pero también permite basar los cálculos en la cobertura de una región específica elegida por el usuario. Como el MM presenta multitud de anomalías cromosómicas de tipo cuantitativo, la región

seleccionada fue el cromosoma 10, uno de los cromosomas más estables de las CP-MM. Después el programa calcula el NC de ADNmt asumiendo que la cobertura del ADNn procede de dos copias.

2.- *Samtools*: Es uno de los programas bioinformáticos más ampliamente utilizados en la actualidad que permite trabajar eficientemente con archivos de secuenciación (163). Se ejecuta por línea de comandos y permite realizar multitud de acciones sobre archivos de secuenciación previamente alineados. En este trabajo *Samtools* se empleó para la extracción de las lecturas alineadas al ADNn y ADNmt que cumplieran con los siguientes criterios:

- Que pasaran el control de calidad de lectura estándar.
- Que no estuvieran marcadas como duplicados.
- Que estuvieran adecuadamente pareadas.
- Que la calidad del alineado fuera superior 30 en la escala Phred, equivalente a

un 99,9% de probabilidad de que las lecturas estuvieran alineadas correctamente.

El número de lecturas alineadas al genoma mitocondrial se comparó con el número de lecturas alineadas al cromosoma 10 y se calculó el NC de ADNmt aplicando la Ecuación 1. Varios trabajos previos confirmaron que aplicando estos criterios de selección la influencia de las lecturas mitocondriales integradas en el ADN nuclear (NUMTs) era mínima (81,164). Para ello compararon los resultados obtenidos con este pipeline con los obtenidos tras una sustracción previa de todas las lecturas del ADNn que mapeaban en el ADNmt y observaron que no existían diferencias significativas en la estimación del NC de ADNmt.

A partir de los datos de secuenciación de exoma completo no se calculó el NC de ADNmt exactas sino la ratio DNAn/DNAmt, que permite comparar el contenido mitocondrial

entre muestras. Esto es debido a que el diseño experimental de la secuenciación de exoma no estudia específicamente regiones del ADNmt si no que extrae las lecturas mitocondriales de regiones off-target. Asumiendo que la captura experimental es exactamente igual a lo largo de las 43 muestras secuenciadas y, por lo tanto, que el sesgo en la amplificación es constante, se puede comparar contenido mitocondrial entre muestras.

3.2.3 Estudio mutacional de los genes implicados en la replicación mitocondrial mediante secuenciación profunda dirigida

Se estudiaron los genes implicados en la replicación del ADNmt mediante secuenciación profunda dirigida en 12 muestras de pacientes en las que previamente se habían analizado el NC de ADNmt mediante RT-PCR. Las muestras correspondían a una fracción 138- de paciente sano y las CP-MM de 4 GMSI, 1 MMq, 5 MMnd y 3 MMr.

Se empleó un panel de genes personalizado desarrollado por el grupo de enfermedades mitocondriales y neuromusculares del Hospital Universitario 12 de Octubre, liderado por el Dr. Miguel Ángel Martín. Este panel cubre los 13 genes nucleares más importantes en el proceso de replicación mitocondrial, los cuales se muestran en la Tabla 12.

<i>MPV17</i>	<i>POLG2</i>
<i>RRM2B</i>	<i>SUCLA2</i>
<i>DGUOK</i>	<i>SUCLG1</i>
<i>OPA1</i>	<i>POLG</i>
<i>TK2</i>	<i>MFN2</i>
<i>TWINKLE</i>	<i>TYMP</i>
<i>SLC25A4</i>	

Tabla 12 Genes incluidos en el panel personalizado del grupo de enfermedades mitocondriales y neuromusculares del Hospital 12 de Octubre.

El procedimiento experimental llevado a cabo para la purificación de CP, extracción y cuantificación de ADN, preparación de librerías, PCR de emulsión y secuenciación fue el mismo que el descrito en los epígrafes del 3.1.2 al 3.1.5.

Se aplicó una profundidad media de secuenciación de 2000X. El control de calidad, alineado de las lecturas, y la llamada y anotación de las variantes encontradas se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el detallado en el epígrafe 3.1.6.

3.3 ESTRATEGIA BASADA EN TEST FARMACOLÓGICOS

- ❖ **Estudio de la respuesta farmacológica ex vivo de pacientes con MM mediante la aplicación de modelos poblacionales.**

3.3.1 Muestras primarias de pacientes

Se emplearon aspirados frescos de MO pertenecientes a pacientes incluidos en el ensayo clínico VIVIA-PMMM (Personalized Medicine Multiple Myeloma). Este ensayo clínico es un estudio observacional, no intervencionista y multicéntrico donde 25 hospitales participaron en el envío de muestras y recogida de datos clínicos. Todos los participantes eran mayores de 18 años, proporcionaron su consentimiento firmado y tenían MM diagnosticado, siendo las muestras o bien de nuevo diagnóstico o bien de recaída. Los datos clínicos recogidos incluían edad, sexo, tipo de MM, valores bioquímicos en el momento de la extracción de la muestra, genética, tratamientos recibidos y respuesta alcanzada.

3.3.2 Ensayo ex vivo

El análisis de sensibilidad ex vivo se llevó a cabo mediante la plataforma tecnológica *PharmaFlow* (144), una plataforma de citometría de flujo multiparamétrica (CFM) que

incorpora una preparación de la muestra automatizada, análisis citométrico y un software analítico que permite una adquisición, análisis y almacenamiento rápido y efectivo de los datos. Esta plataforma permite el empleo de muestras de MO y sangre periférica permitiendo medir hasta 2000 puntos por muestra y evaluar el efecto selectivo de los fármacos sobre una o varias subpoblaciones celulares simultáneamente. Su empleo ha permitido el procesado de cientos de muestras de pacientes en los últimos años, y la creación de una gran base de datos farmacológicos.

➤ **Ensayo de depleción**

Las muestras se recibieron en el laboratorio dentro de las primeras 24h tras la extracción. En un análisis inicial se evaluó el número de células patológicas y su viabilidad. El resto de la muestra se diluyó y dispensó en placas de 96 pocillos para su posterior incubación con los distintos fármacos a diversas concentraciones y tiempos de incubación(132). Los anticuerpos CD138, CD319, CD45, CD38, y CD56 se emplearon para identificar las células plasmáticas junto a ForwardScatter (FSC)/SideScatter(SSC) y la Annexina-V para excluir las células apoptóticas, de manera que fue posible determinar cuántas células patológicas sobreviven a la acción del fármaco (Figura 17). Se utilizaron 8 puntos de concentración para construir las curvas de dosis respuesta (Anexo 3). Dependiendo del fármaco se ensayaron desde 1 hasta 5 tiempos de incubación distintos. Tras la incubación, se contabilizó el número de CP-MM vivas a cada punto de concentración. Los ensayos de potenciación del efecto del Bortezomib con uno o dos fármacos adicionales se utilizó las mismas dosis empleadas en su monoterapia y, además, dosis constantes de la droga suplementaria en cada uno de los pocillos, es decir, 10 μ M de Dexametasona y 10 μ M de Prednisona.

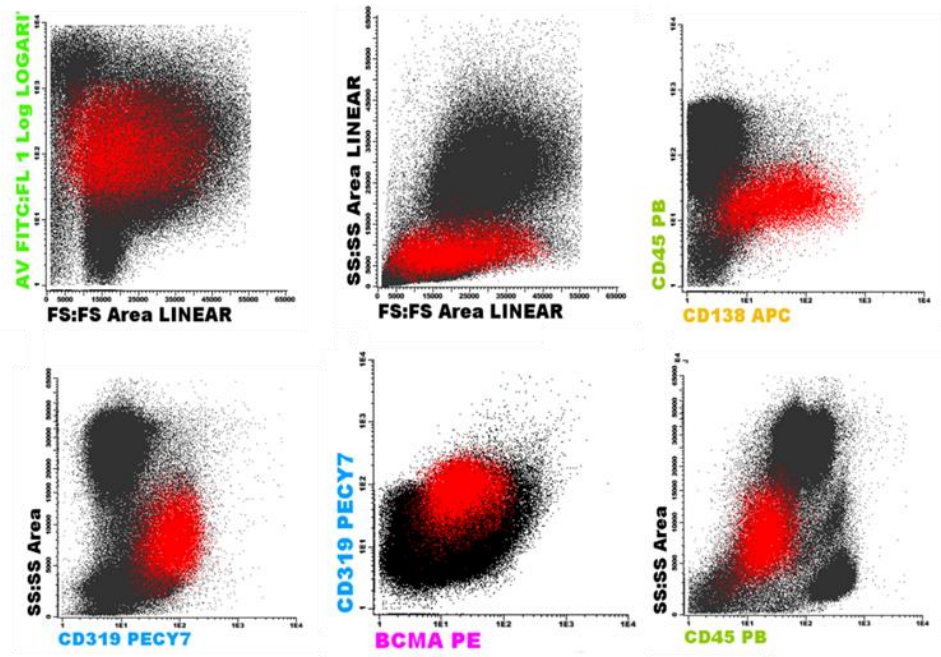


Figura 17 Estrategia de gating representativa para la identificación de las CP-MM (rojo) en una muestra de paciente de MM.

➤ Ensayo de proliferación

El ensayo de proliferación llevado a cabo en la evaluación de la actividad anti-proliferativa de la Lenalidomida y Pomalidomida se realizó de la misma manera que el ensayo de depleción, pero además incluyó la sonda Vibrant CFDA SE cell tracer kit (Invitrogen) para la monitorización de la proliferación. Se midió el número de células en los que se producía una reducción de la intensidad de fluorescencia del CFDA como consecuencia de la división de la célula madre en 2 células hijas (Figura 18). Además, para combatir la escasa proliferación que las CP-MM muestran ex vivo, se añadió un 20% en volumen de plasma autólogo de cada paciente. Esto no solo mejoró la viabilidad de las células reduciendo la tasa de muerte espontánea, sino que además favoreció su proliferación estabilizando el cultivo celular.

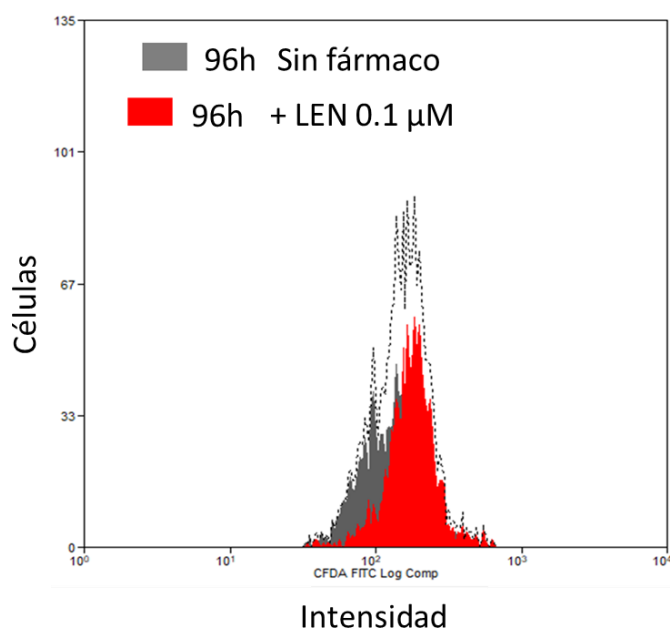


Figura 18 Caso representativo de la inhibición de la proliferación medido con CFDA usando muestra completa de MO más el 20% de plasma autólogo. En gris se muestra el marcaje de las CP-MM en ausencia de fármaco. En rojo, se observa como en presencia de Lenalidomida no se produce disminución del marcaje de CDFA de las CP-MM por división celular.

3.3.3 Evaluación de la respuesta ex vivo:

➤ Construcción del modelo poblacional con NONMEM.

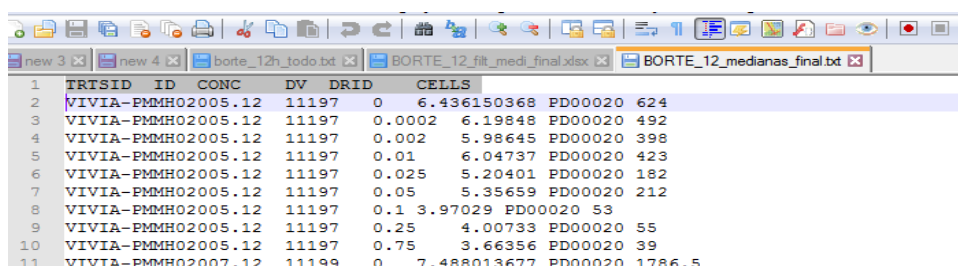
Para facilitar el análisis, evaluación y representación gráfica de los modelos además de NONMEM también se utilizaron herramientas auxiliares como los softwares Perl Speak NONMEM (PsN) , Pirana (153) y Tibco- Spotfire .

➤ Ficheros de entrada

NONMEM traduce las características del modelo PK/PD definidas por el usuario para calcular los parámetros poblacionales e individuales, por lo que requiere que el usuario introduzca ficheros de entrada que contengan los datos y las instrucciones en el formato adecuado.

Los dos ficheros que NONMEM requiere son:

- **Fichero.dta** = contiene los datos experimentales como el código de la muestra, puntos de dosis, tiempo de incubación, número de células, logaritmo del número de células, tipo de fármaco etc. Cada observación debe estar contenida en una línea diferente correctamente identificada. Las observaciones procedentes de un mismo paciente deben estar consecutivas y las dosis ordenadas de menos a menor.



	TRTSID	ID	CONC	DV	DRID	CELLS
1	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0	6.436150368	PD00020	624
2	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.0002	6.19848	PD00020	492
3	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.002	5.98645	PD00020	398
4	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.01	6.04737	PD00020	423
5	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.025	5.20401	PD00020	182
6	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.05	5.35659	PD00020	212
7	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.1	3.97029	PD00020	53
8	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.25	4.00733	PD00020	55
9	VIVIA-PMMH02005.12	11197	0.75	3.66356	PD00020	39
10	VIVIA-PMMH02007.12	11199	0	7.488013677	PD00020	1786.5

Figura 19 Cabecera de un archivo .dta

- **Fichero.inp** = contiene las instrucciones que NONMEM debe seguir en todas las etapas del modelado (Figura 20). Las partes más importantes de este fichero son:

```

1 $PROB Population Model Drug bor12_libre_01
2 $INPUT TRID=DROP ID CONC DV DRID=SKIP CELLS
3 $DATA 4_bd_bor12_med.dta IGNORE(DRID.NE. 'PD00020')
4
5
6 $PRED
7
8 EO=THETA(1)*EXP(ETA(1))
9
10 TVEM=THETA(2)
11 PHI=LOG(TVEM/(1-TVEM))
12 IMAX=EXP(PHI+ETA(2))/(1+EXP(PHI+ETA(2)))
13
14 IC50=THETA(3)*EXP(ETA(3))
15 GAM=THETA(4)*EXP(ETA(4))
16
17 AA=CONC**GAM
18 BB=IC50**GAM
19 IPRED=LOG(EO*(1-IMAX*AA/(AA+BB)))
20
21
22 W=THETA(5)*EXP(ETA(5))
23
24 Y=IPRED+W*EPS(1)
25 IRES=DV-IPRED
26 IWRES=(DV-IPRED)/W

```

Figura 20 Cabecera de un fichero .inp. \$Pred precede al modelo matemático aplicado para llevar a cabo el modelado.

- \$PRED → permite escribir un modelo propio en ecuaciones explícitas de forma independiente a las librerías de modelos predefinidas. Se debe escribir el modelo completo, incluyendo los parámetros, el modelo farmacodinámico y los modelos de variabilidad.
- \$THETA → asigna valores de los parámetros poblacionales mínimos, máximos y de inicio. Los límites inferiores y superiores deben ser lógicos y ser ajustados por el usuario en cada caso particular. Se pueden fijar para que no se itere añadiendo FIX.
- \$OMEGA → Corresponde a los valores de variabilidad interindividual poblacionales, asignando las estimaciones iniciales para la matriz de varianza-covarianza.
- \$ERROR → define la ecuación correspondiente a las observaciones de modo que define la variabilidad residual.

$$Y=F+EPS()$$

Y=observación F=valor esperado según el modelo

- \$SIGMA → Corresponde a los valores de variabilidad interindividual de cada individuo asignando las estimaciones iniciales para la matriz de varianza-covarianza del error residual.

➤ **Ficheros de salida**

NONMEM genera multitud de ficheros de salida, algunos de los más importantes son:

- Pars → este fichero contiene los parámetros farmacológicos individuales calculados para cada individuo.

- Sdtab→contiene los valores individuales predichos y los observados, así como valores de errores residuales.
- Phi→ contiene la matriz de varianza-covarianza generada.
- Ext → contiene información sobre la construcción del modelo, como número de iteraciones y valores poblacionales alcanzados en cada una de ellas.

➤ **Herramientas gráficas que permiten interactuar con NONMEM**

- **PsN** (Perl Speak Nonmem): combinación de herramientas para llevar a cabo simulaciones y predicciones con NONMEM. Permite implementar bootstraps y chequeos predictivos visuales.
- **PIRAÑA**: es una interfaz gráfica para NONMEM. Permite modificar el modelo, ejecutarlo, generar ficheros de salida y visualizar los resultados

Una vez preparados estos archivos, se procedió a la ejecución del modelo.

➤ **Elección del modelo**

Para llevar a cabo una evaluación diagnóstica del modelo, se consideraron varios factores:

1. Que los valores poblacionales obtenidos no se encuentren cerca de los límites establecidos en el inp. Si es así, habría que relanzar el modelo o bien que suavizar las condiciones de restricción.
2. Que los errores residuales sean bajos, es decir, que los valores observados no difieran mucho de los valores predichos por el modelo. La función objetiva es una medida de la bondad del ajuste, por lo tanto, un modelo será mejor que otro si tiene un valor de la función objetiva menor. Esta comparación únicamente puede hacerse entre modelos que utilizan la misma base de datos.

La mejor manera de confirmar esto es con una representación gráfica donde se enfrenten los valores predichos y los observados. Cuanto más se acerquen los valores a la diagonal mejor será el modelo.

➤ **Representación gráfica de los modelos**

Para representar gráficamente los modelos obtenidos se ha empleado el programa *Spotfire*. En el eje x se muestran las dosis ensayas en escala logarítmica. En el eje Y se representa el índice de supervivencia, que corresponde a la fracción de células patológicas vivas en % que quedan tras la exposición al fármaco a cada concentración testada (Figura 21).

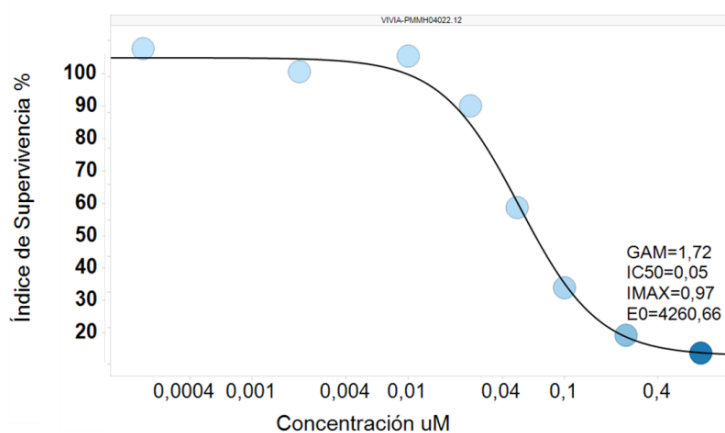


Figura 21 Curva típica de dosis-respuesta individual en términos de índice de supervivencia %.

En las representaciones de los modelos poblacionales se obvian los puntos experimentales para facilitar su exploración visual. Las unidades de la EC50 serán unidades de concentración del eje X, y las de la Emax el efecto alcanzado expresado como el eje Y.

➤ **Cálculo del área bajo la curva (AUC).**

Debido a la variabilidad en los valores de potencia y eficacia de cada fármaco, no se pueden comparar parámetros farmacológicos de distintas drogas para determinar las diferencias de sensibilidad o resistencia de los pacientes a las mismas. Por este motivo, es habitual calcular un parámetro farmacológico adicional llamado área bajo la curva o AUC (de las siglas en inglés Area Under the Curve) que incorpora la información de los 4 parámetros farmacodinámicos clásicos y que se obtiene mediante la integración de la función que describe el modelo entre dos límites de la variable independiente (X), es decir, la concentración del fármaco. Sus límites de integración varían en función de cada aplicación (Figura 22). En este trabajo se establecieron como límites de integración en el eje X la concentración a la cual se observó inicio de la actividad farmacológica y la concentración máxima alcanzada por cada fármaco en MO. Además, se establecen como límites superiores e inferiores de integración el porcentaje 90 y 10 de índice de supervivencia (eje Y) para eliminar del cálculo las regiones más variables y de mayor incertidumbre del perfil farmacológico, que son las de mayor y menor dosis. Esta acotación permite seleccionar únicamente las regiones más informativas y con menor incertidumbre del modelo, para así llevar a cabo un cálculo del AUC que capture las propiedades farmacológicas de cada paciente de una manera más exacta y reproducible.

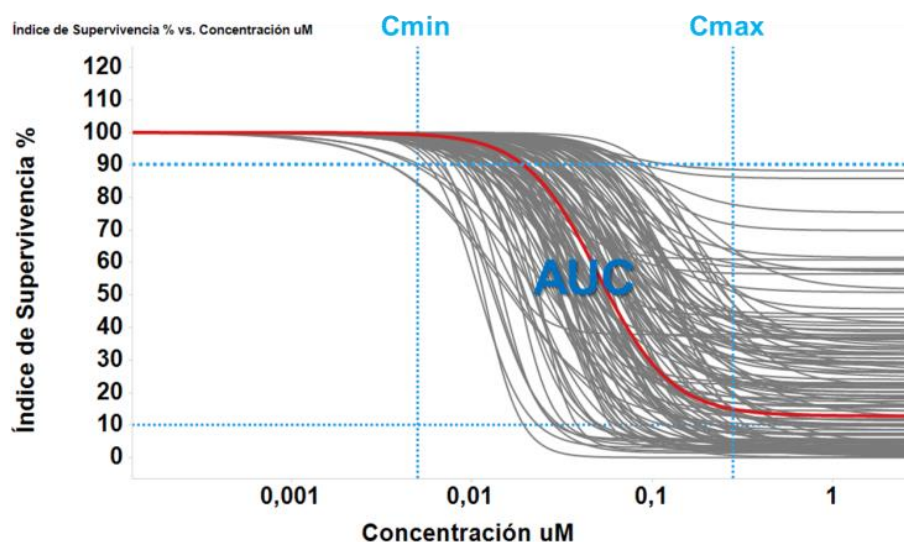


Figura 22 Interpretación visual de área bajo la curva (AUC), con límites de integración para el eje X comprendidos entre Cmin (inicio de la actividad) y Cmax (concentración del fármaco máxima en MO) y para el eje Y entre 10 y 90% de supervivencia.

El AUC calculada para cada curva dosis-respuesta tanto individual y como poblacional se normalizó dividiendo entre el área máxima obtenida para cada modelo, pudiendo ser así comparada entre los distintos fármacos evaluados y detectar diferencias en la sensibilidad de cada droga entre paciente.

➤ **Obtención de los intervalos de confianza de los parámetros poblacionales individuales.**

Para poder determinar la certidumbre que presentan los parámetros farmacológicos obtenidos tanto individuales como poblacionales para cada fármaco, fue necesario calcular sus intervalos de confianza (IC) mediante la realización de simulaciones.

Los IC son un rango de valores centrados en cada parámetro que indican la probabilidad de que un valor caiga en ese punto. Para valores de n suficientemente grandes siguen una distribución normal, por lo que se puede hablar de percentiles para computar los límites del IC. Habitualmente se seleccionan los valores de 97.5 y 2.5, que deja fuera el

al 5% de los valores. Estos intervalos son obtenidos a través de simulaciones basadas en la matriz de varianzas que proporciona NONMEM (ETA), y se calcularon en los IC poblacionales como individuales. El número de simulaciones mínimas recomendado es 100, aunque a mayor número mayor precisión (y mayor el coste computacional). En este trabajo se han empleado 1000 simulaciones para cada estimación. Los CI representados corresponden a los percentiles 2.5 y 97.5 de los 1000 parámetros obtenidos en las simulaciones. Las simulaciones se llevaron a cabo con un programa propio construido en R.

4.- RESULTADOS

4. RESULTADOS:

4.1 ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN NUCLEAR

4.1.1 *Descripción del escenario mutacional: genes y rutas metabólicas alteradas.*

En los 79 pacientes de nuevo diagnóstico estudiados mediante ultra secuenciación profunda dirigida de los 77 genes más frecuentemente mutados en MM, se detectaron un total de 168 mutaciones no sinónimas, es decir, mutaciones que originan un cambio en la secuencia de aminoácidos respecto a la secuencia de DNA de referencia (Figura 23).

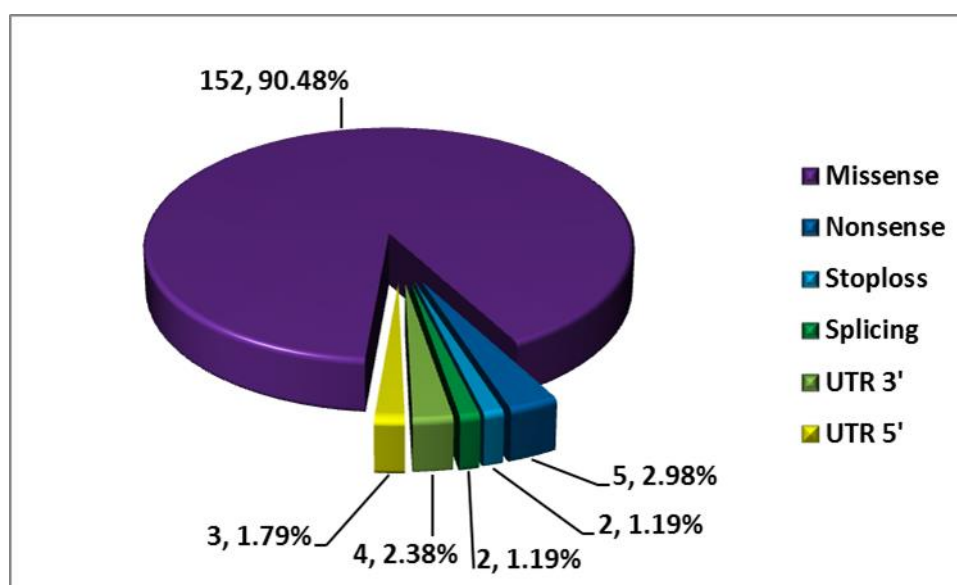


Figura 23 Mutaciones detectadas categorizadas según el tipo de cambio de aminoácido y su localización.

Del total, 81 de ellas (48%) fueron consideradas como patogénicas por los predictores SIFT y POLYPHEN-2, herramientas bioinformáticas que se basan en cuantificar *in silico* el impacto estructural que supone el cambio de base en la secuencia del DNA (Referencias sift). Además, 61 de ellas (36%) había sido descritas en la base de datos *Catalogue of*

Somatic Mutations in Cancer database (COSMIC)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>), la cual recoge las mutaciones somáticas descubiertas en todos los tipos de cáncer humano.

Se detectaron mutaciones en el 85% de los pacientes estudiados, con una media de 2.1 mutaciones por paciente. De los 77 genes estudiados, se detectaron mutaciones en 53 de ellos, aunque 5 genes albergaron el 42% del número total de mutaciones. Estos genes fueron: *KRAS* (21.5% de los pacientes), *DIS3* (19%), *NRAS* (16.5%), *BRAF* (10.1%) and *TP53* (8.8%) (Figura 24).

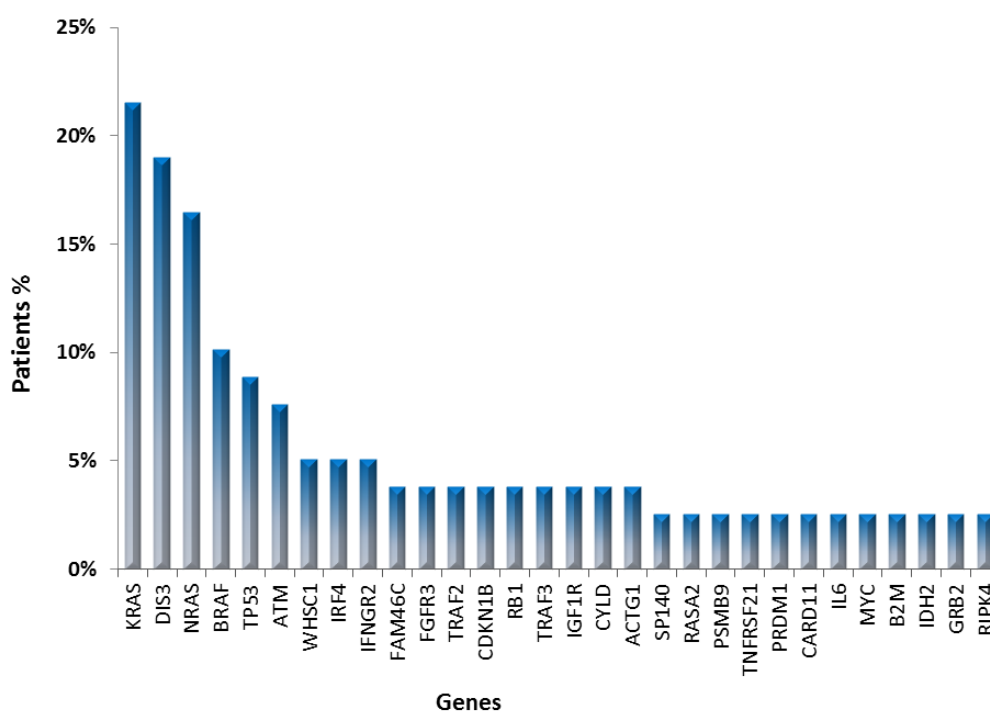


Figura 24 Genes alterados (eje x) y su frecuencia mutacional en porcentaje de pacientes (eje y).

La baja recurrencia mutacional existente en los pacientes de MM hace necesario que las alteraciones no pueden únicamente ser estudiadas a nivel de gen, si no que haya que agruparlas a nivel de ruta metabólica alterada. Las rutas de señalización correspondientes al set de genes contenidos en este panel se detallan en la Tabla 13.

NFκB		RAS	CRBN	CICLINAS	MYC	IDH	MAF	PROTEOSOMA	IL-6	HISTONA	APOPTOSIS
BIRC2	RIPK4	BRAF	CRBN	CCNB1	MAX	IDH1	MAF	PSMB5	CSNK2A1	KDM6A	TP53
BIRC3	TLR4	EGFR	CUL4A	CCND1	PRDM1	IDH2	MAFB	PSMA1	GRB2	WHSC1	ATM
CARD11	TNFRSF13B	FGFR3	CUL4B	CCNT1	XBP1	IDH3A		PSMB8	IL6		
CYLD	TNFRSF21	IGF1R	IKZF1	CDK4				PSMB9	IL6R		
MAP3K14	TNFSF9	KRAS	IKZF3	CDK7				PSMD1	IL6ST		
MYD88	TRAF2	NRAS	IRF4	CDKN1B					JAK2		
NFKBIB	TRAF3	RASA2	MYC	CDKN2A					PTPN11		
RIPK1	TRAF3IP1			CDKN2C					SHC1		

Tabla 13 Agrupación de los genes contenidos en el panel en función de la ruta metabólica en la que están implicados.

La ruta más frecuentemente alterada en nuestra cohorte fue la ruta RAS/MAPK, donde el 31.5% de las mutaciones se detectaron en genes correspondientes a esta ruta (53/168), estando alterada en un 49% de los pacientes (39/79) (Figura 25). Las mutaciones en *KRAS* aportaron el 40% (21/53) de las mutaciones de esta ruta, seguido por mutaciones en *NRAS* 26% (14/53) y *BRAF* 15% (8/53). El 72 y 100% de las mutaciones en *KRAS* y *NRAS* respectivamente se detectaron en los codones hotspots 12,13 y 61. La mutación V600E de *BRAF* fue detectada en un paciente. En tres pacientes se detectaron mutaciones coexistentes en los genes *KRAS* Y *BRAF*, mientras que los pacientes con mutaciones en *NRAS* presentaron ninguna otra mutación correspondiente a un gen de su misma ruta metabólica.

La segunda ruta más frecuentemente alterada fue la ruta NFkB, recogiendo el 15% del número total de mutaciones (25/168) y mutada en el 25% de los pacientes (18/79) (Figura 25). Se detectaron 5 mutaciones en el gen *TRAF3* (1 nonsense y 4 missense) en 3 pacientes, seguido de 3 mutaciones en el gen *TRAF2*, las 3 missense en tres pacientes distintos. Cabe destacar que todas ellas fueron predichas como patogénicas por los predictores SIFT y POLYPHEN-2.

Otras rutas con impacto significativo en la cohorte de pacientes estudiado fueron la ruta de apoptosis, con 8 mutaciones en *TP53* en 7 pacientes y 8 en *ATM* en 6 pacientes, correspondiendo al 8.9% del total de las mutaciones detectada (Figura 25). La ruta Cereblon aportó 9 mutaciones presentes en 7 pacientes, entre las que destacan 4 mutaciones en el gen *IRF4*, todas ellas missense y 3 predichas patogénicas por SIFT y POLYPHEN-2. La ruta de las ciclinas se encontró alterada en 5 pacientes una mutación por paciente.

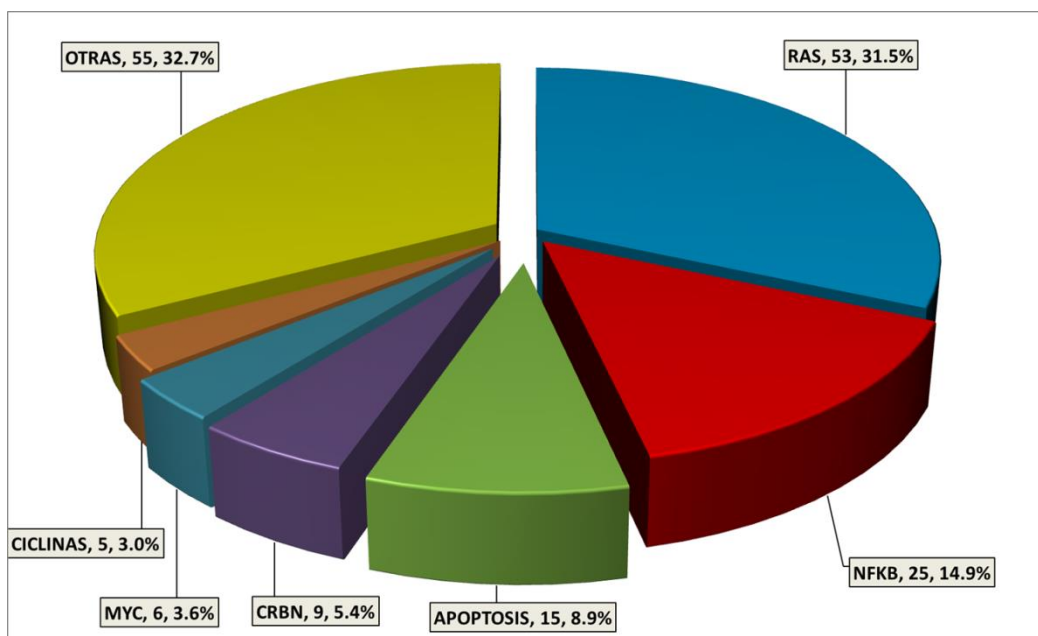


Figura 25 Rutas alteradas y su proporción tanto en número total de mutaciones como en porcentaje de pacientes.

4.1.2 Recurrencia mutacional

Atendiendo al número de mutaciones de los pacientes, el 60% presentó más de una mutación en alguno de los genes estudiados (48/79). Dentro de este subgrupo de pacientes, el 30 % de ellos mostró mutaciones con una frecuencia alélica (FA) muy similar (14/48), mientras que el resto mostró valores de FA más distantes, con mutaciones desde el 5% al 70% de FA. Esta complejidad sublonal pudo ser confirmada

en 3 de los pacientes gracias al estudio del ADN de células sanas correspondiente a la fracción CD138 negativa (Tabla 14 Lista de pacientes y sus mutaciones en los que se pudo confirmar mediante secuenciación de fracción de células sanas que las mutaciones encontradas correspondían únicamente a células patológicas y no tenían origen germinal, confirmando así la presencia de subclones en distintas proporciones.). De esta manera se pudo descartar que las mutaciones con un valor de FA sospechoso de ser germinal (del 40 al 60% de FA) tuvieran tal origen, y por tanto, las mutaciones estaban presentes a diferentes proporciones únicamente en células tumorales.

PATIENT	GENE	FUNCTION	PTEIN	VRF(%)	GERM_FRACTION
24	DIS3	missense	E501K	8%	Not found
24	DIS3	missense	F120L	53%	Not found
24	IDH2	missense	T435M	65%	Not found
40	DIS3	missense	D479G	13%	Not found
40	TP53	missense	D208V	35%	Not found
40	TP53	nonsense	E204*	36%	Not found
257	NRAS	missense	Q61E	7%	Not found
257	NRAS	missense	G12A	6%	Not found
257	IFNGR2	missense	R39C	37%	Not found

Tabla 14 Lista de pacientes y sus mutaciones en los que se pudo confirmar mediante secuenciación de fracción de células sanas que las mutaciones encontradas correspondían únicamente a células patológicas y no tenían origen germinal, confirmando así la presencia de subclones en distintas proporciones.

Se detectaron 12 pacientes con mutaciones múltiples en el mismo gen; 4 pacientes presentaron más de una mutación en *DIS3*, 3 pacientes en *KRAS*, 2 pacientes en *NRAS*, 1 paciente en *MAX*, 1 paciente en *TRAF3* y 1 paciente en *TP53*. No se encontró ninguna asociación entre la presencia de mutaciones múltiples y variables clínicas, genéticas o supervivencia. Sin embargo, cabe destacar las mutaciones múltiples en *MAX* y uno de los pacientes con *DIS3*.

Las 3 mutaciones del paciente con el gen MAX mutado fueron missense y estaban localizadas en hotspots bien conocidos de este gen: E32V, R35L and R36K (178,179). Las FA de las 3 mutaciones fue 26, 21 y 10 % respectivamente, lo que significa que estaban presentes a nivel subclonal, en una determinada fracción o clon de células plasmáticas. Sorprendentemente, gracias a su proximidad en la secuencia de ADN fue posible determinar que cada variante estaba localizada en una lectura de secuenciación diferente, lo que significa que cada mutación procedía de una hebra de ADN distinta, y, por tanto, de una CP-MM distinta (Figura 26). Además, los datos citogenéticos de este paciente confirmaron que presentaba un cariotipo diploide y dado que la suma de la FA de las 3 mutaciones fue del 50%, todo apunta a que el 100% de las células tumorales estaba afectado por mutaciones en MAX, pero una evolución clonal paralela dio origen a 3 subclones distintos. El mismo hallazgo pudo hacerse en uno de los pacientes con 2 mutaciones simultáneas en el gen *DIS3* (Figura 26), las cuales también fueron detectadas en hotspot de este gen D487H and D479E y a nivel subclonal, con una FA del 4 y 21% respectivamente. Este paciente también presentó cariotipo diploide, por lo que en este caso la mitad de las células plasmáticas tumorales estaban afectadas por mutaciones en *DIS3* y donde una posible evolución clonal paralela originó dos subclones diferentes.

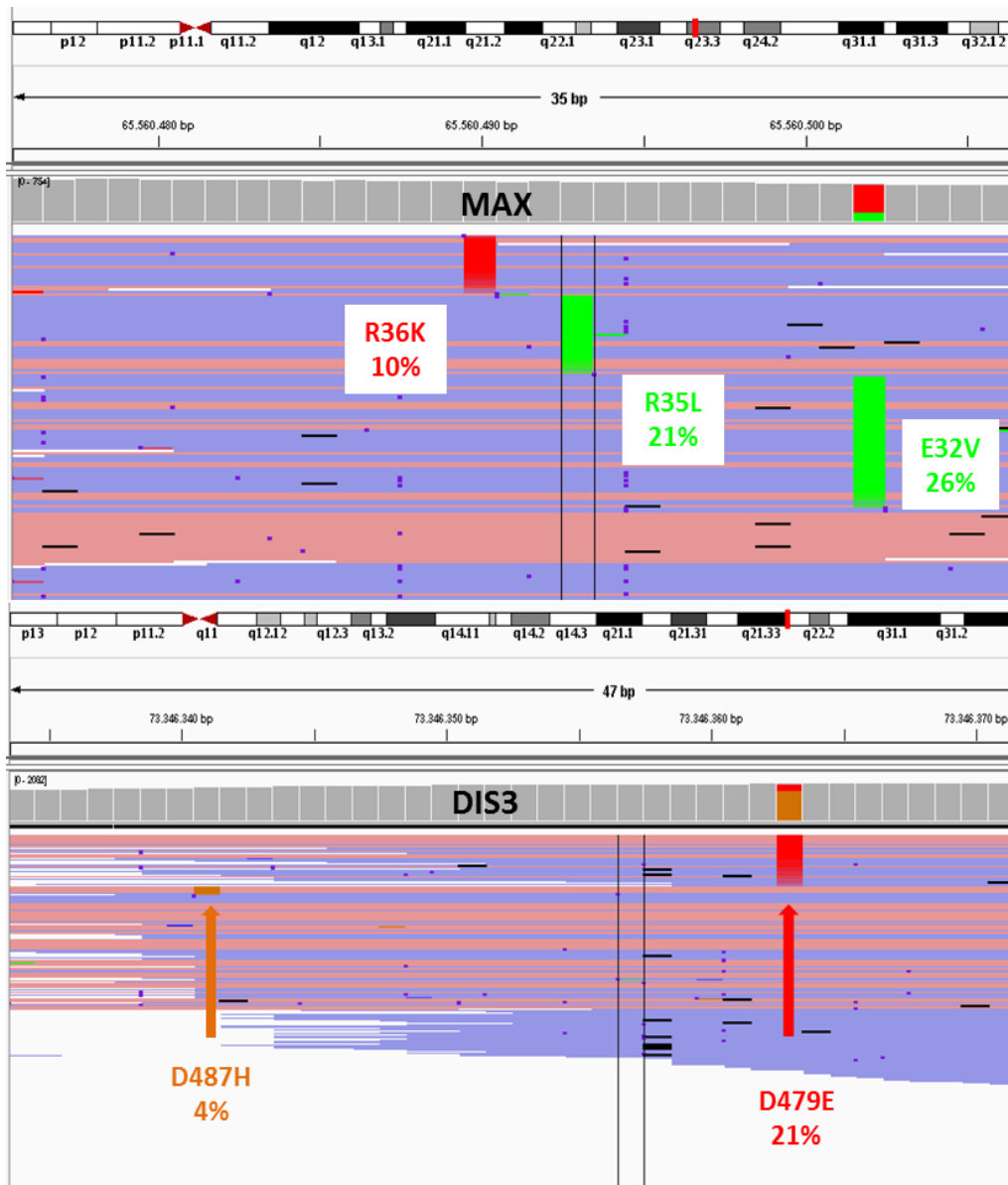


Figura 26 Visualización de IGV mostrando que las mutaciones múltiples detectadas en dos de los pacientes dentro del mismo gen MAX y DIS3 correspondían a lecturas diferentes y, por tanto, estaban presentes en células independientes.

4.1.3 Estudio de la frecuencia alélica

El estudio de la frecuencia alélica de las mutaciones detectadas en nuestra cohorte de pacientes mostró que el 50% de ellas (85/168) fueron detectadas a FA por debajo del 25%, y lo más destacable, que el 27% de las mutaciones mostraron valores de FA inferiores al 10% (Figura 27). Debido a la gran heterogeneidad mutacional

característica del MM, la mayoría de los genes no se encuentran recurrentemente mutados en nuestra cohorte de pacientes, y por tanto el estudio de la FA se realizó sobre los 5 genes con una recurrencia mutacional más alta (Figura 28).

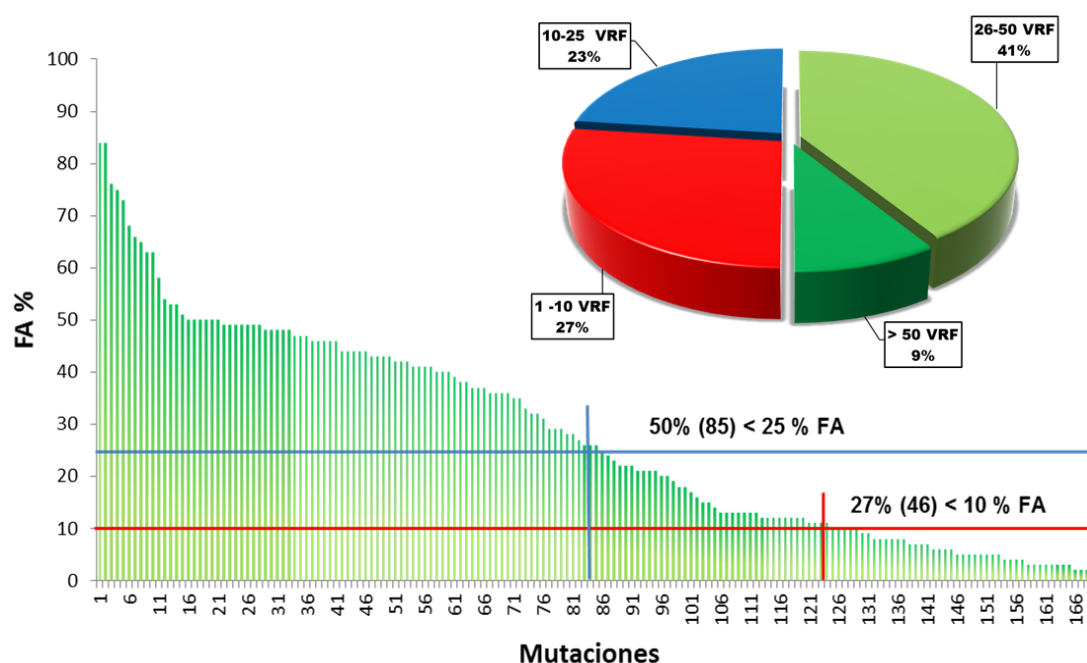


Figura 27 Distribución en orden descendente de la frecuencia alélica para cada una de las 168 mutaciones detectadas. El diagrama de sectores muestra la proporción de mutaciones dentro de cada valor de FA señalado.

El 100% de las mutaciones encontradas *KRAS* (21) se detectaron a valores de FA inferiores al 50%, 11 de ellas a valores inferiores al 20% y 5 a valores inferiores al 10% (Figura 28). Todas las mutaciones por debajo del 20% fueron predichas como patogénicas por los predictores SIFT y POLYPHEN-2 y todas fueron descritas en publicaciones anteriores por lo que están contenidas en la base de datos COSMIC. Además, todas excepto 3 se localizan en los codones 12,13 y 61, conocidos y más que descritos dominios de actividad GTPasa de *KRAS* (Figura 29.A).

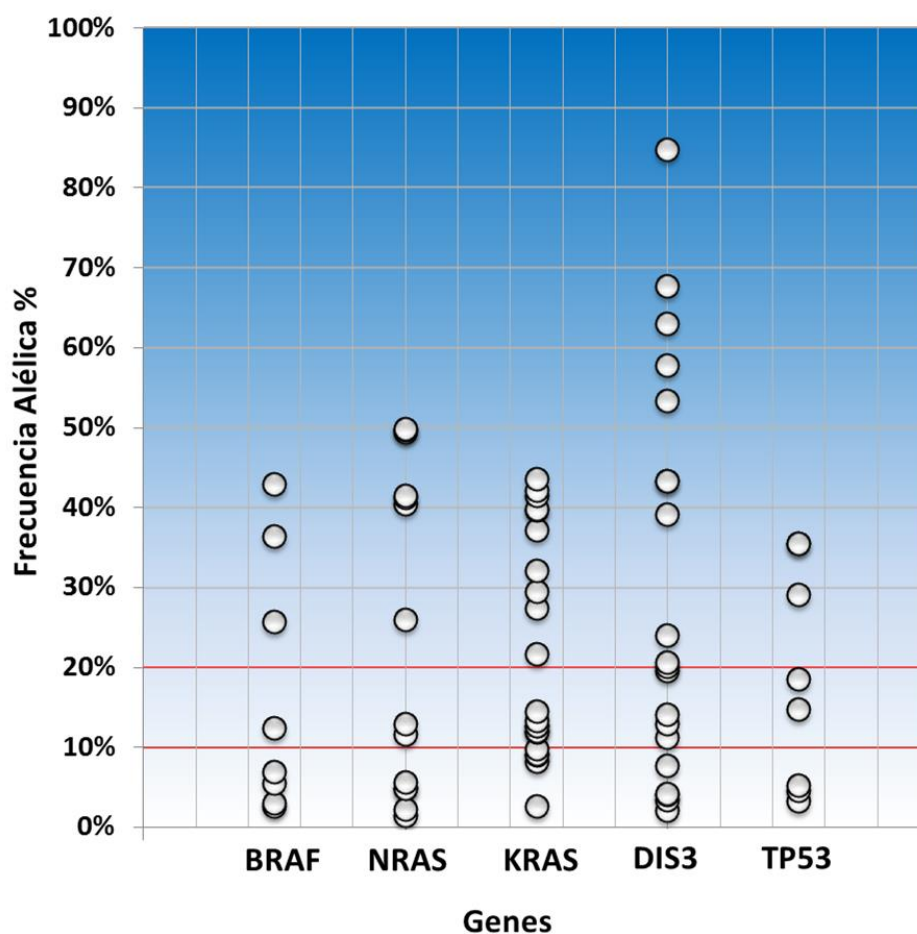


Figura 28 Representación de la frecuencia alélica de las mutaciones detectadas en los 5 genes más frecuentemente mutados

De las 14 mutaciones encontradas en *NRAS*, solo una superó el 50% de FA, 7 presentaron valores de FA inferiores al 20% y 4 inferiores al 10% (Figura 28). Todas las mutaciones por debajo del 20% de FA fueron predichas patogénicas por SIFT, aunque solo una lo fue por POLYPHEN-2. Sin embargo, todas se encuentran descritas previamente en la base de datos COSMIC y se localizan en los codones 12,13 y 61 correspondientes al dominio activo GTPasa (Figura 29.B).

El 100% de las mutaciones en *BRAF* (8) se detectaron a valores de FA inferiores al 50%, 5 por debajo del 20% y 4 por debajo del 10% de FA. De las 5 detectadas por debajo del 20%, todas fueron predichas patogénicas por SIFT y 4 también por

POLYPHEN-2. Además 3 de las 5 habían sido descritas previamente en COSMIC. La mutación diana B600E se detectó con una FA del 36%. Todas las mutaciones por debajo del 20% de FA se localizaron el dominio tirosina quinasa del gen (Figura 29.C).

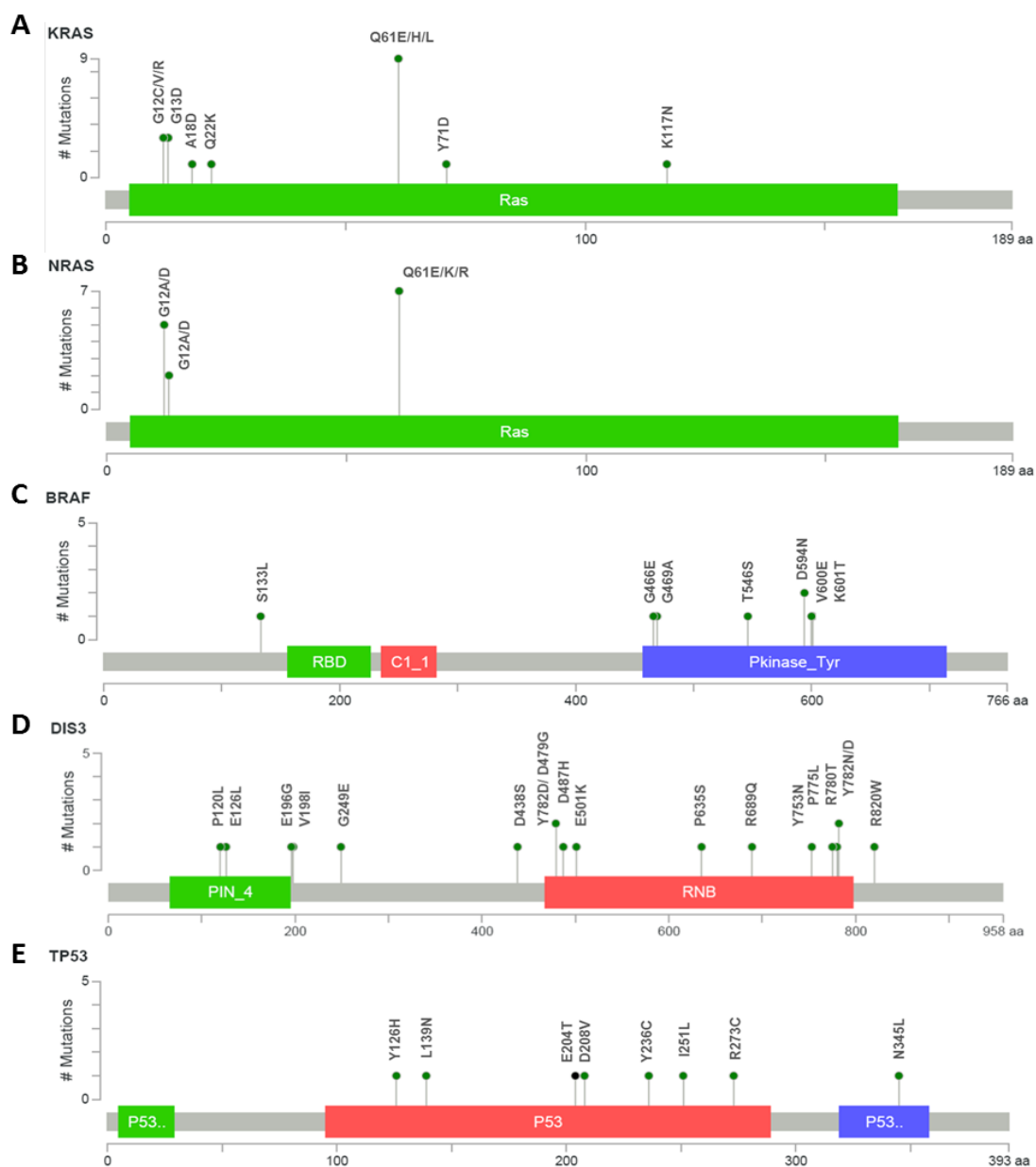


Figura 29 Lolly-plots representando el número de mutaciones y su localización dentro de cada gen.

DIS3 fue el gen que presentó un mayor intervalo de FA, 5 de las 20 mutaciones encontradas presentaron valores superiores al 50% de FA, 10 mutaciones inferiores al 20% y 5 inferiores al 10% de FA (Figura 28). Todas las mutaciones por debajo del 10%

fueron predichas como patológicas por SIFT y POLYPHEN-2. Además 4 de estas 5 mutaciones se detectaron en el dominio catalítico de RNB el cual alberga el mayor número de mutaciones recogidas por la bibliografía (Figura 29.D).

Todas las mutaciones de *TP53* se presentaron por debajo del 50% de FA, 5 por debajo del 20% y 3 por debajo del 10% de FA. Todas fueron predichas como patológicas por SIFT y POLYPHEN-2 y habían sido descritas previamente en COSMIC (Figura 29.E).

Del total de las 71 mutaciones detectadas en estos 5 genes, el 51% mostraron valores de FA inferiores al 20% (38) y el 30% (21) por debajo del 10%.

➤ **Correlación de alteraciones citogenéticas y las mutaciones.**

Para llevar a cabo con significancia estadística el estudio de la correlación entre genes mutados y alteraciones citogenéticas únicamente se consideraron aquellos genes mutados en 5 o más pacientes, siendo los mismos que los seleccionados para el estudio de la frecuencia alélica del apartado anterior.

Se encontró que *DIS3* estaba significativamente mutado en el subgrupo de pacientes con la traslocación t(4:14), estando alterado en el 5% de los pacientes positivos para esta aberración ($p=0.008$) (Figura 30). Los genes *NRAS* y *TP53* se encontraron significativamente mutados en el subgrupo de pacientes con la traslocación t(11:14), donde el 36% y 27.2 % de los pacientes con dicha traslocación presentaron mutaciones en estos genes respectivamente. ($p_{NRAS}=0.037$ y $p_{TP53}=0.014$) (Figura 30). Pacientes que positivos para la ganancia 13q y la traslocación t(4:14) también mostraron tener significativamente asociada la ganancia 1q. Sorprendentemente, un único paciente con la aberración citogenética del17p presentó simultáneamente mutación en el gen *TP53*.

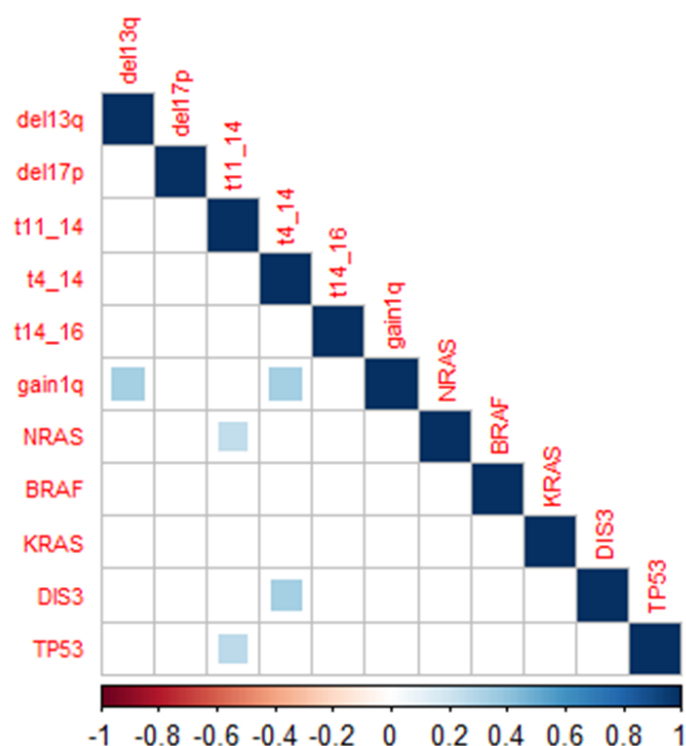


Figura 30 Square-plot representando las correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre alteraciones genéticas y mutaciones. El color del cuadrado determina si es asociativa (azul) o excluyente (rojo).

4.1.4 Análisis de supervivencia

➤ Variables clínicas y demográficas

En este estudio se evaluó el impacto de variables demográficas y clínicas en la supervivencia, así como el de las mutaciones detectadas en genes individualmente y agrupados en función de la ruta metabólica a la que pertenecían.

Como era de esperar, las variables clínicas y demográficas que mostraron un mayor impacto en la supervivencia de los pacientes, tanto en la SLP como en la SG, fueron la edad, *International Staging System* (ISS) y el estado general de los pacientes al diagnóstico (ECOG). Sin embargo, este impacto no presenta significancia estadística cuando son considerados de manera independiente, aunque sí se detectaron como las

variables más explicativas al realizar un análisis de supervivencia multivariable empleando el método de regresión de Cox, mostrando el menos valor de AIC.

➤ **Mutaciones en genes/ rutas**

Respecto a las variables genéticas, no se detectó un impacto significativo en la SLP ni en la SG en los pacientes que presentaron mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *DIS3* o *ATM*. Tampoco se encontró diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes con algunos de los genes de las rutas RAS o NFκB mutados. Sin embargo, los pacientes con mutaciones en el gen *TP53* sí mostraron SLP y SG significativamente más cortas que el resto, ($P = 0.019$ and 0.004 , respectivamente) (Figura 31.A). También se encontraron diferencias significativas en la SLP y la SO de los pacientes con alguno de los genes de la ruta Cereblon mutados, presentando supervivencias más cortas que el resto ($P = 0.040$ and < 0.0001 , respectivamente) (Figura 31.B). La presencia de mutaciones múltiples en el mismo gen mostró no tener ningún impacto en la supervivencia de los pacientes, al igual que el número de mutaciones a nivel subclonal con FA por debajo del 40%. Sin embargo, el número total de mutaciones sí demostró afectar la supervivencia de los pacientes, de manera que los pacientes con más de tres mutaciones en los genes estudiados (o más 1 mutación por 61 kb de ADN analizado) presentaron tiempos de recaída y de muerte más cortos que los que presentaron un número de mutaciones menor ($P = 0.033$ and 0.002 , respectivamente) (Figura 31.C). El análisis de supervivencia multivariante usando el modelo de regresión de Cox también detectó el impacto negativo en la supervivencia de las mutaciones en el gen *TP53* ((SLP: [HR], 3.68; 95% CI, 1.45–9.29, $P = 0.005$); (OS: HR, 9.07; 95% CI, 2.78–9.57, $P = 0.0002$)). Sin embargo, el impacto de las mutaciones en la ruta Cereblon y el número total de

mutaciones no pudo ser estudiado por esta metodología debido a una gran asociación entre estas dos variables con la edad.

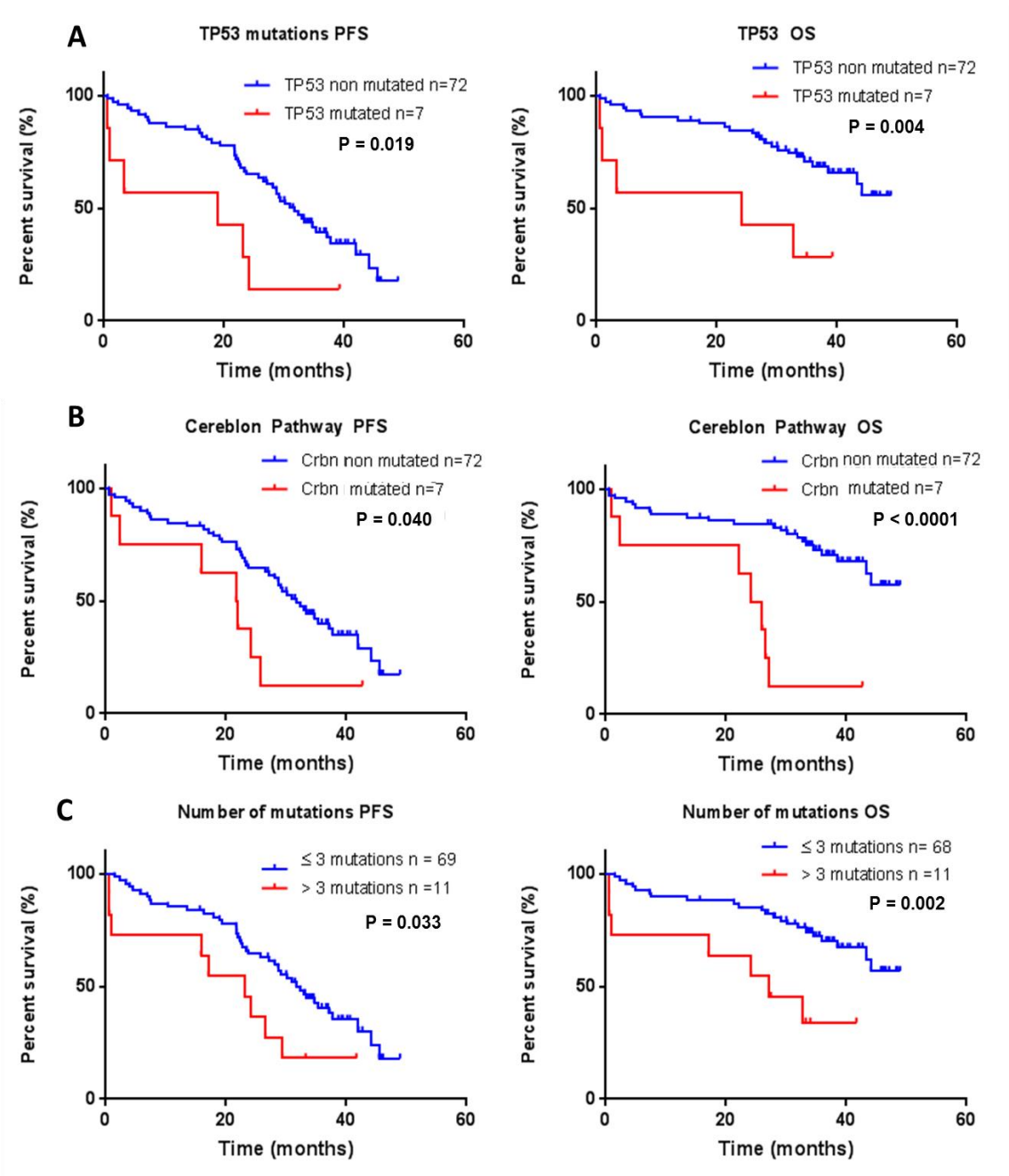


Figura 31 Curvas de supervivencia libre de progresión (izquierda) y supervivencia global (derecha) que muestran el impacto significativo de la presencia de mutaciones en el gen TP53, genes de la ruta Cereblon y el número de mutaciones totales.

4.2 ESTRATEGIA MOLECULAR: ADN MITOCONDRIAL:

4.2.1 Estimación del NC de ADNmt en los distintos estadios del MM mediante RT-PCR

El estudio del NC de ADNmt mediante RT-PCR mostró que las CP y demás células de la MO de paciente sanos contenían un número inferior de NC de ADNmt que las CP-MM correspondientes a cualquier estadio de la enfermedad (39 vs 106 copias; $P = 0.02$.) Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre el NC de ADNmt entre GMSI, MMs, MMnd y MMr (Figura 32).

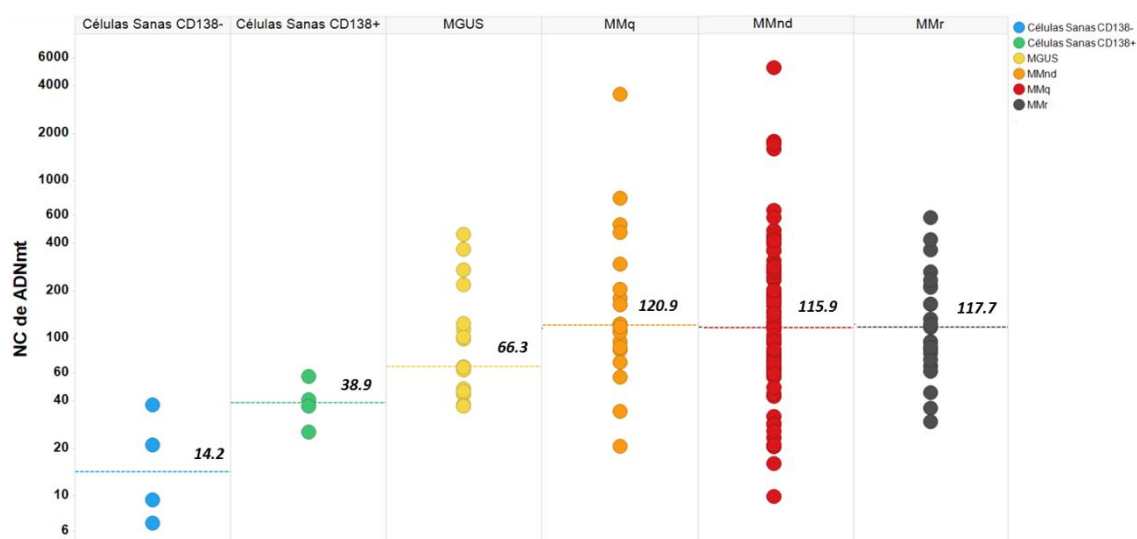


Figura 32 Número de copias de ADNmt obtenido de células plasmáticas de pacientes sanos y en distintos estadios del MM obtenidos por RT-PCR.

Se encontró una gran dispersión en el NC de ADNmt de cada subgrupo de pacientes, siendo llamativamente alto en los pacientes con MMnd, con valores que oscilaron en un rango de 5 a 2108 NC (mediana=115.9 \pm 629 copias).

➤ **Evaluación del impacto pronóstico de NC de ADNmt en pacientes con MMnd.**

El impacto en la supervivencia fue calculado en 69 de los 78 pacientes con MMnd analizados por RT-PCR. Se encontró que los pacientes con mayor NC de ADNmt presentaban cierta tendencia a recaer en tiempos menores que los pacientes con un menor NC de ADNmt, aunque la diferencia en la supervivencia no fue significativa (Figura 33). Sin embargo, se encontró que los pacientes con un NC de ADNmt por encima de 400 si mostraban unos tiempos de recaída significativamente más cortos en términos de SLP, siendo 400 copias un valor crítico a partir del cual los pacientes mostraron un pronóstico más desfavorable (21.6 vs 29.4 meses. [HR] 3.78; 95% [CI] 1.49-9.63, $P=0.005$) (Figura 33).

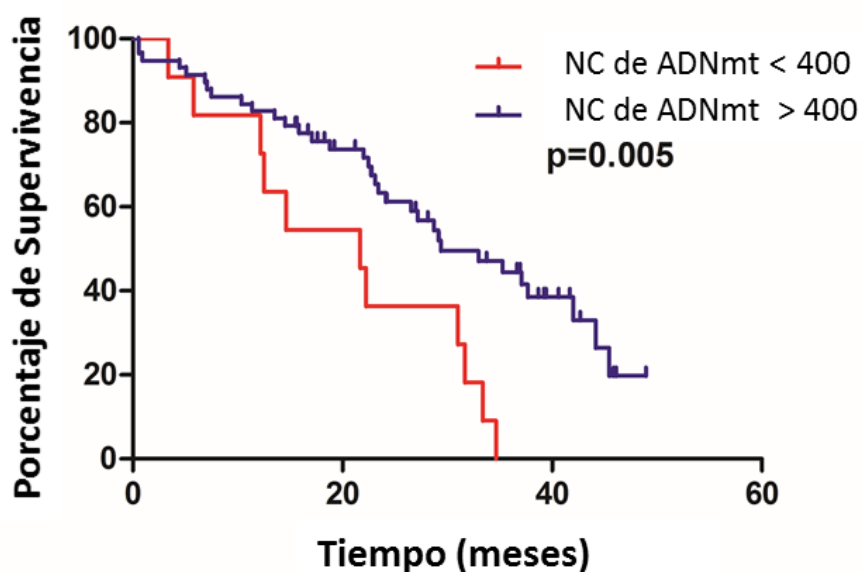


Figura 33 Curva de supervivencia Kaplan Meier. Los pacientes con un NC por encima de 400 mostraron SLP significativamente más cortas que el resto. (21.6 vs 29.4 meses. [HR] 3.78; 95% [CI] 1.49-9.63, $P=0.005$).

4.2.2 Variación del NC de ADNmt con la progresión de la enfermedad

Se calculó la variación en el NC de ADNmt en muestras pareadas 11 pacientes de los cuales se disponía de los datos de secuenciación de genoma completo de sus CP-MM en el estadio de MM quiescente y MM de nuevo diagnóstico. En 9 de los 11 pacientes analizados (82%) se encontró un aumento del NC de ADNmt en la muestra de MMnd con respecto a la de MMq (Figura 34).

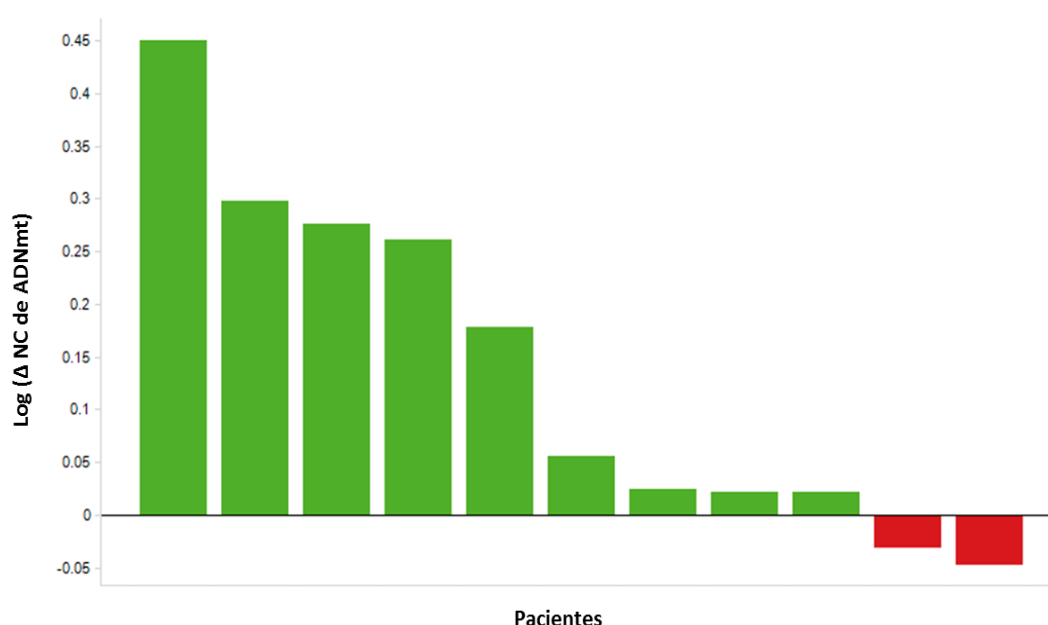


Figura 34 Diferencia entre el número de copias de ADNmt entre la muestra de MMq y MMnd, expresado en escala logarítmica. El color de la barra indica si se encontró un aumento (verde) o disminución (rojo) del número de copias con la progresión de la enfermedad.

Además, se encontró asociación entre la variación del contenido mitocondrial y el tiempo de progresión. Pacientes con tiempos de progresión menores de 10 meses presentaban una variación en el NC de ADNmt significativamente menor que aquellos cuya progresión a MM sintomático se producía en un tiempo mayor de 10 meses. (0.02 vs 0.27; $p=0.03$) (Figura 35). Esto indicaría que las CP de pacientes con MMq de alto

riesgo son más parecidas a las del MM sintomático en términos de contenido mitocondrial.

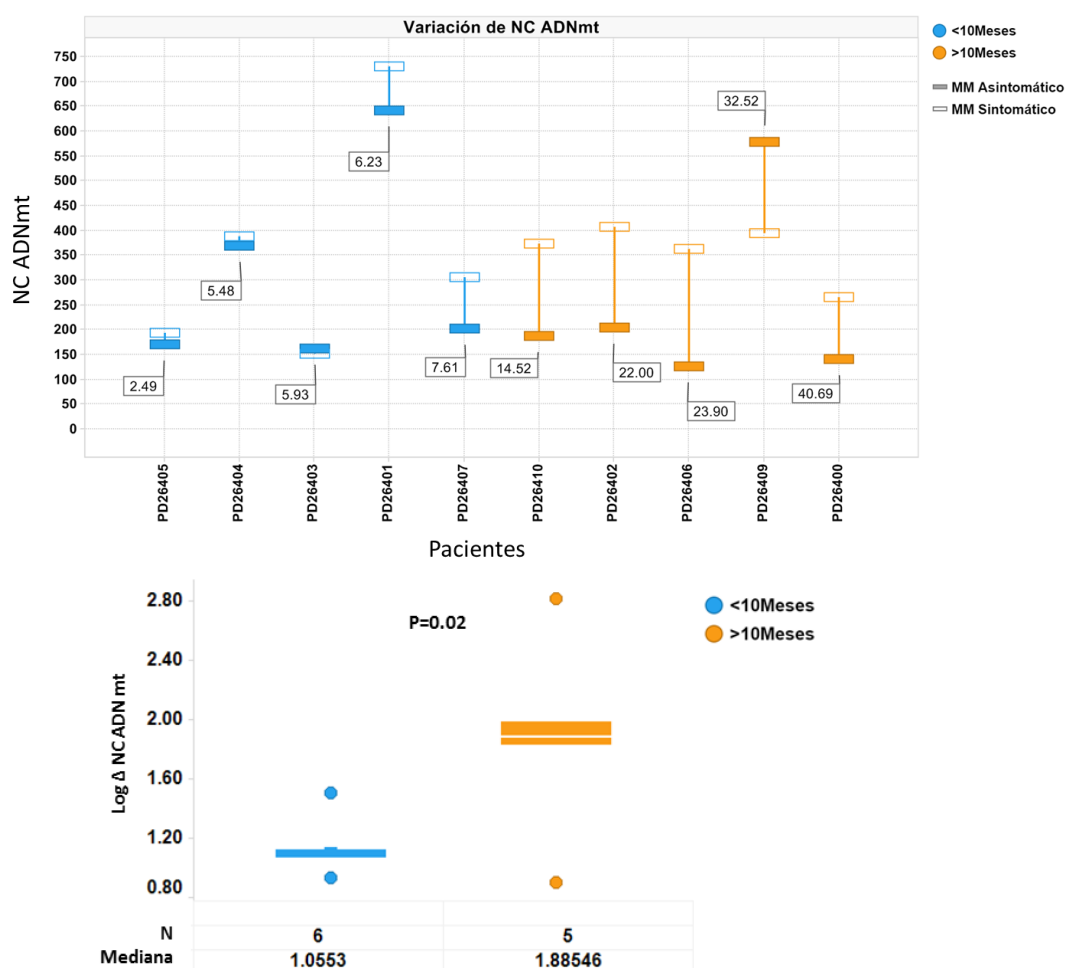


Figura 35 Asociación entre la variación del NC de ADNmt y el tiempo de progresión. Arriba se muestra los valores de NC obtenidos de muestras pareadas. Pacientes que progresan en menos de 10 meses presentan variaciones significativamente más pequeñas del NC de ADNmt ($p=0.02$).

La estimación del contenido mitocondrial en muestras de recaídas consecutivas del mismo paciente mostró resultados similares: en 17 de los 21 pacientes (81%) se encontró una mayor carga mitocondrial en la muestra de la última recaída que en la muestra de la recaída inmediatamente anterior, incluyendo aquellos pacientes de los que se disponía 3 muestras de recaídas consecutivas (Figura 36).

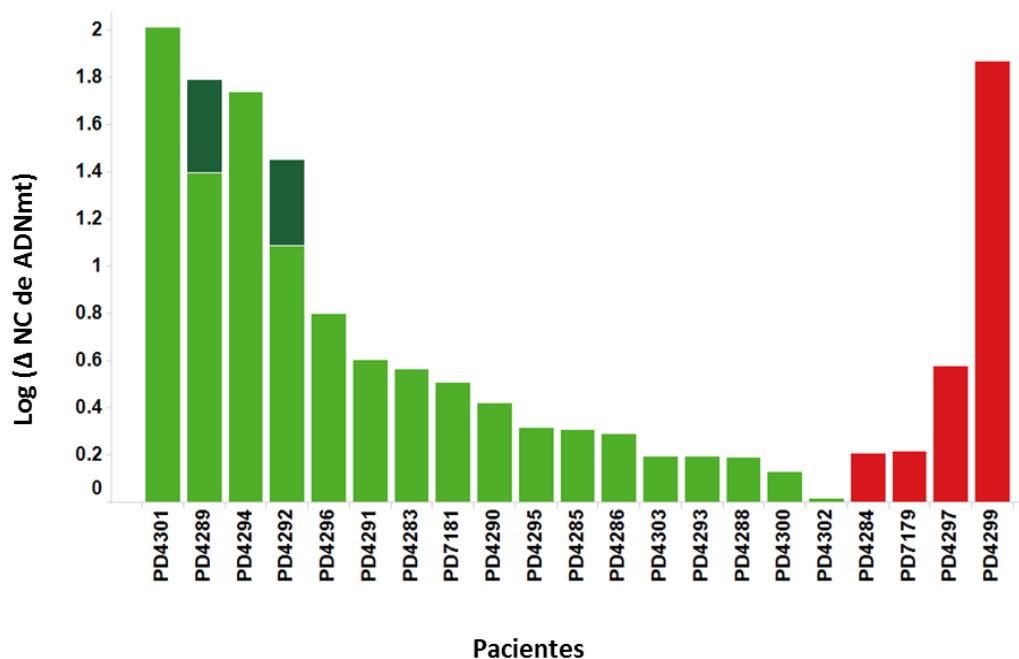


Figura 36 Diferencia entre el contenido de ADNmt entre dos recaídas consecutivas expresado en escala logarítmica. El color de la barra indica si se encontró un aumento (verde) o disminución (rojo) con la progresión de la enfermedad. La barra verde oscuro muestra la diferencia entre la tercera y segunda recaída en los dos pacientes con tres muestras de recaída consecutivas disponibles.

4.2.3 Expresión de los genes reguladores de la biogénesis mitocondrial

Con el fin de determinar si el aumento en el contenido mitocondrial se correspondía con un aumento de la expresión de los genes que regulan la biogénesis mitocondrial se realizó un análisis de expresión diferencial. Para ello se emplearon datos de expresión de array (Affymetrix Human Genome U133A) correspondientes al estudio GSE6477 contenidos en la base de datos oncogenómica canEvolve.org (165). Este estudio contiene datos de expresión de 162 muestras primarias de CP-MM correspondientes a pacientes sanos y en distintos estadios del MM (Tabla 15). Se analizó la expresión diferencial de los genes más relevantes implicados en la síntesis mitocondrial descritos en la bibliografía: *TFAM* o factor de transcripción mitocondrial A (166,167), *NRF1* o factor de transcripción nuclear 1 (168,169), el protooncogen *MYC* (170,171), *TUFM* o

factor de elongación traslacional mitocondrial (172) y *HNRNPK* o ribonucleoproteína heterogénea K (173,174).

ESTADIO	Nº	TFAM		MYC		TUFM		HNRNPK		NRF1	
		logFC	adj. Pvalue	logFC	adj. Pvalue	logFC	adj. Pvalue	logFC	adj. Pvalue	logFC	adj. Pvalue
NORMAL-GMSI	15 vs 22	0.34	0.0007	NS		NS		NS		0.26	0.002
NORMAL-MMQ	15 vs 24	0.38	0.001	NS		NS		NS		0.18	0.09
NORMAL-MM	15 vs 73	0.39	0.001	1.1	0.003	0.49	0.002	0.38	0.005	-0.21	0.01
NORMAL-MMr	15 vs 28	0.43	0.01	1.48	0.004	0.52	0.001	0.44	0.01	-0.23	0.04

Tabla 15 Análisis de expresión diferencial de los genes reguladores de la biogénesis mitocondrial en los diferentes estadios del MM.

Se encontró una sobreexpresión de los genes reguladores de la biogénesis mitocondrial en muestras de CP-MM comparadas con CP de pacientes sanos.

TFAM y *NRF1* estaban sobre expresados en todos los estadios del MM, siendo mayor su sobreexpresión en las etapas más avanzadas como el MMnd o MMr (Tabla 15). *MYC* Y *TUFM* no se encontraron significativamente sobre expresados en muestras de GMSI y MMq, pero sí en muestras correspondientes a los estadios sintomáticos del MM (Tabla 15).

4.2.4 Estudio mutacional de los genes implicados en la replicación mitocondrial mediante secuenciación profunda dirigida

El estudio de los genes implicados en la replicación mitocondrial mostró la presencia de 3 mutaciones en 3 de las 12 muestras analizadas (Tabla 16).

MUESTRA	GEN	FUNC	CAMBIO	LOC	PTEIN	POS_COV	VAR_COV	VRF(%)	SIFT/Polyphen	NC de ADN mt
MMq	POLG	missense	A/G	Exón 18	S933G	3234	1609	50%	Patogénica	57.1
MMr_1	POLG	missense	G/T	Exón 9	Q538K	4494	1421	32%	Moderado	214.2
MMr_2	POLG2	missense	G/C	Exón 1	G67Q	2985	1102	37%	Moderado	191.5

Tabla 16 Mutaciones detectadas mediante secuenciación profunda dirigida de 13 genes implicados en la replicación mitocondrial y NC de ADNmt determinado por RT-PCR.

Una mutación en un paciente con MMq en la subunidad catalítica del gen *POLG*, S933G, missense y predicha como patogénica por los dos predictores SIFT y Polyphen-2. Una segunda mutación en este mismo gen, pero en una muestra de paciente con MMr, Q538K en el exón 9, missense y con impacto moderado según los predictores SIFT y Polyphen-2 (Figura 37).

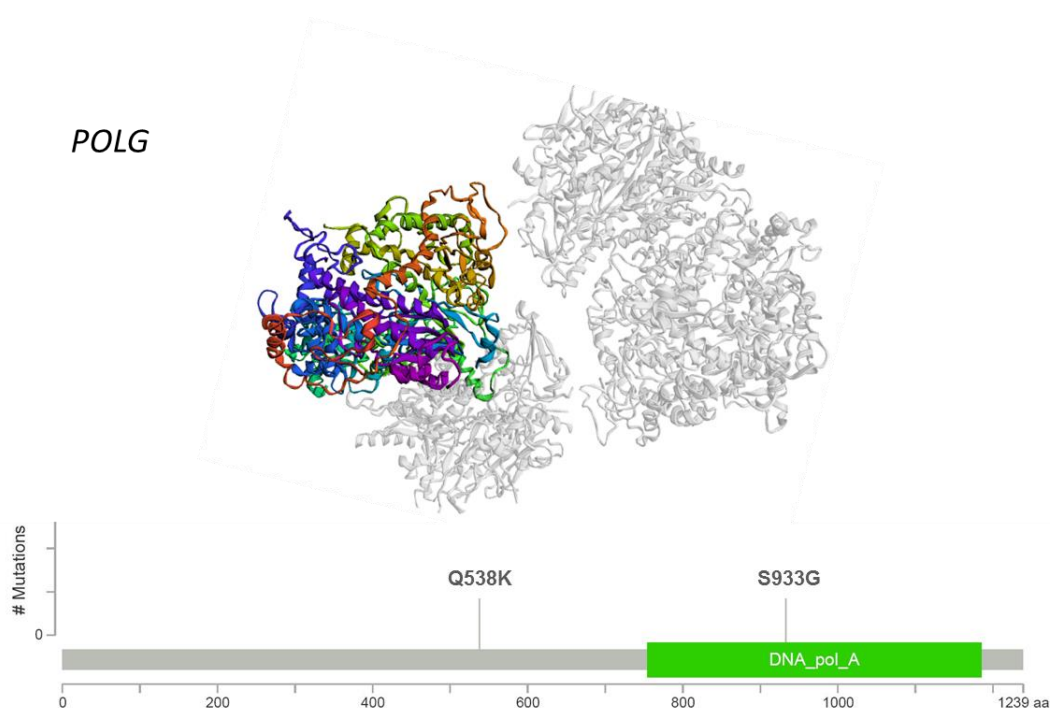


Figura 37 Subunidad de la proteína POLG y localización de las 2 mutaciones detectadas en este gen.

La tercera mutación fue encontrada en un paciente con MMr en el gen *POLG2*, G67Q, missense, situada en la subunidad accesoria de la proteína y con impacto moderado según los predictores SIFT y Polyphen (Figura 38).

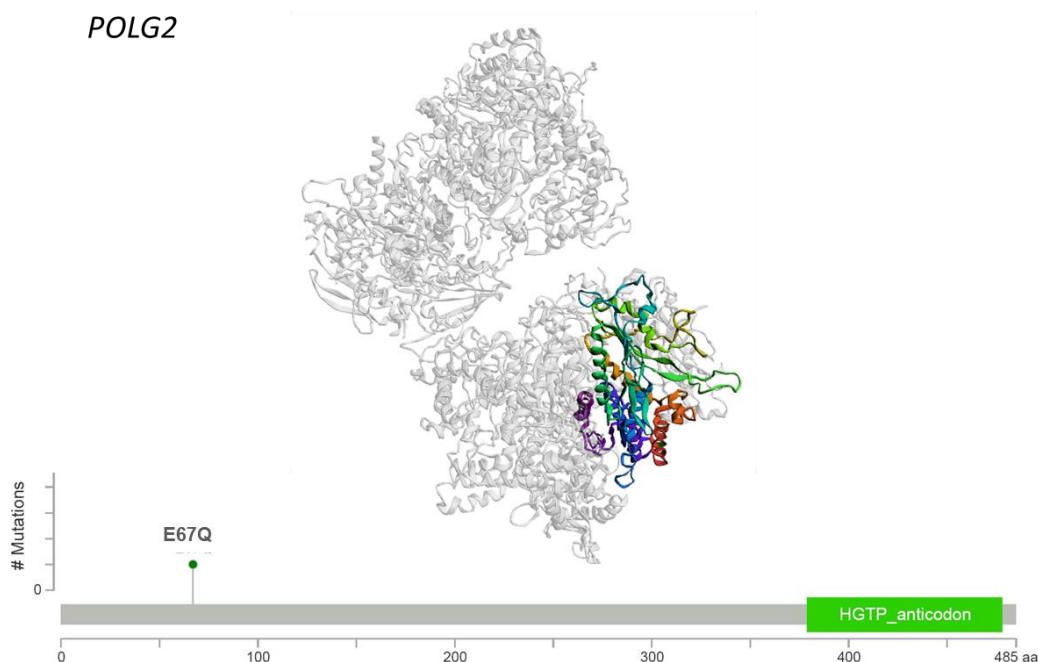


Figura 38 Subunidad de la proteína *POLG2* y localización de la mutación detectada en este gen.

4.3 ESTRATEGIA BASADA EN TEST FARMACOLÓGICOS

- ❖ **Modelado poblacional para la caracterización farmacodinámica ex vivo de las drogas comúnmente empleadas en el tratamiento del MM**

4.3.1 *Determinación del impacto del número de células en el modelado poblacional del Bortezomib.*

Para evaluar el impacto que el número de células iniciales tenía en el modelado farmacológico del Bortezomib se construyeron los modelos poblacionales extrayendo secuencialmente los individuos que presentan menor número de células, a 12h y aplicando un modelo libre de restricciones en los parámetros farmacodinámicos.

La Tabla 17 muestra los parámetros farmacodinámicos poblacionales y las variabilidades entre pacientes obtenidos tras la eliminación de las muestras con número de células por debajo de 100, 200, 300, 400 y 500 respectivamente.

N muestras	161		147		127		121		113	
Min nº cél	100		200		300		400		500	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
F. Obj	-926.798	*	-897.187	*	-815.06	*	-789.738	*	-744.004	*
E0	928.225	10.87	1114.38	10.14	1419.65	9.77	1527.48	9.74	1682.57	9.72
IMAX	0.867	2.18	0.866	2.34	0.864	2.67	0.867	2.73	0.866	2.86
EC50	0.049	7.5	0.049	7.78	0.05	8.64	0.051	8.79	0.05	9.23
GAM	2.076	4.09	2.056	3.82	1.977	3.82	1.968	3.8	1.971	4

Tabla 17 Variación de los parámetros farmacodinámicos poblacionales del modelo libre del Bortezomib a 12h con la exclusión de muestras con bajo número de células patológicas.

El número de células patológicas iniciales presentó impacto únicamente en el parámetro poblacional E0, que es el que define el número de células vivas a dosis 0 del fármaco. Sin embargo, el impacto sobre el resto de los parámetros fue despreciable, produciéndose a nivel del segundo decimal en adelante. Tampoco se observó variación significativa en los valores de variabilidad inter-paciente obtenidos para cada parámetro poblacional. La función objetiva en este caso disminuyó al ser directamente dependiente del número de entradas, ya que se define como el sumatorio de las diferencias entre el valor observado y el valor predicho por el modelo de cada entrada.

4.3.2 Estudio cinético del comportamiento ex vivo del Bortezomib.

Para determinar las condiciones óptimas de incubación para la caracterización ex vivo del perfil farmacológico del Bortezomib fue necesario determinar cómo afectaba el tiempo de incubación a la respuesta farmacológica.

Se ensayaron 66 muestras de MO de pacientes incluidos en el ensayo clínico VIVIA-PMMM a 3 tiempos de incubación distintos: 12, 24 y 48h. Además, se llevó a cabo el modelado aplicando 2 aproximaciones diferentes:

Modelo Libre: o modelo de 4 parámetros donde no se establece ninguna restricción en ninguno de ellos, aunque si se pueden limitar entre valores que lógicos para el ensayo. La EC50 se limitó entre 0 y 4 μM y La Emax entre 1 y 0, ya que se expresó términos de índice de supervivencia (porcentaje de células patológicas vivas).

Modelo Fijo: o modelo de 3 parámetros donde la Emax se fijó a 1 para simular un modelo en el que se asume que siempre se alcanza el máximo efecto, ya sea dentro del rango de concentración ensayada como fuera de él. Esto permite obtener las condiciones idóneas para llevar a cabo un análisis comparativo de la potencia de un fármaco ya que proporciona valores de EC50 referidos a la actividad o eficacia absoluta. Además, el valor del parámetro gamma, que se relaciona de manera más directa con el mecanismo de acción del fármaco, se calculó poblacionalmente y se fijó para cada muestra individual permitiendo una mínima variabilidad (<2%) para permitir mejor ajuste del modelo.

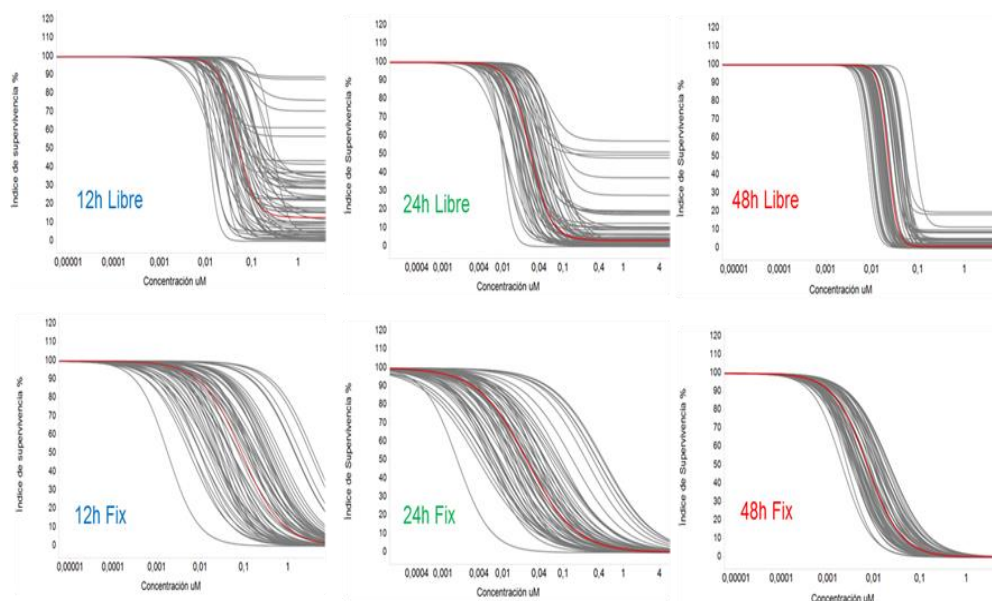


Figura 39 Modelos farmacodinámicos ex vivo del bortezomib a los 3 tiempos ensayados. La línea roja describe el comportamiento poblacional obtenido para cada modelo a cada tiempo

Se encontró que La E_{max} poblacional de los modelos libres aumentó con el tiempo de incubación, implicando una mayor eficacia antitumoral del Bortezomib (Figura 40).

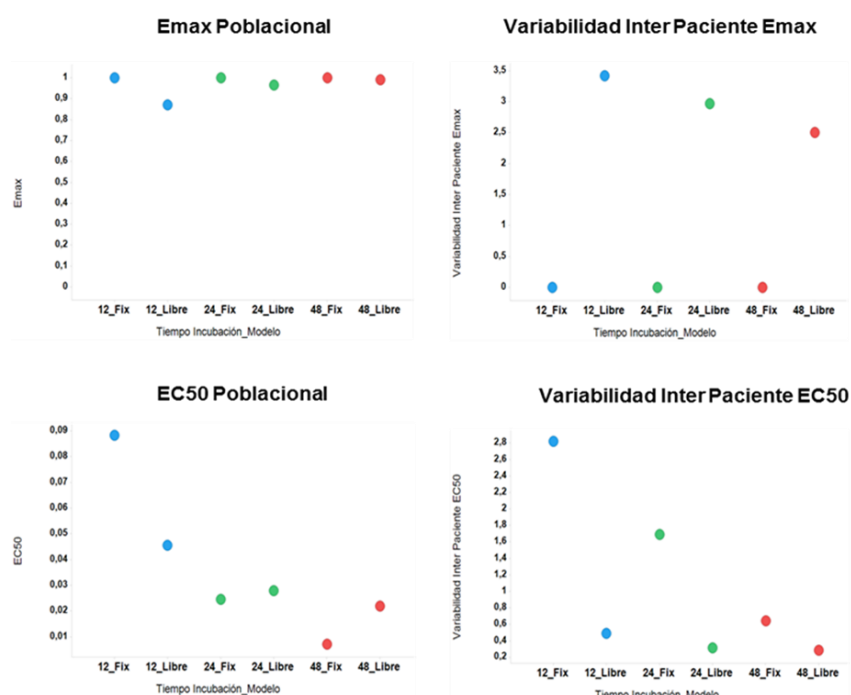


Figura 40 Representación gráfica de los parámetros farmacodinámicos E_{max} y EC_{50} poblacionales y sus variabilidades inter paciente obtenidos para cada uno de los dos modelos calculados a cada tiempo

Además, la variabilidad entre los pacientes en términos de E_{max} disminuyó con el tiempo, disminuyendo el poder de estratificación de los pacientes al aumentar el tiempo de exposición al fármaco (Figura 40). A pesar de esto, las diferencias en la E_{max} fueron pequeñas. La EC_{50} disminuyó al aumentar el tiempo de incubación, tanto en el modelo libre como en el de E_{max} fija. Además, la variabilidad entre pacientes también disminuyó con el aumento del tiempo (Figura 40). A 48h la variabilidad detectada entre pacientes en términos de EC_{50} fue muy baja y cercana al valor del error aditivo del modelo.

Para la evaluación de la bondad de ajuste se examinó la función objetiva y el error aditivo de cada modelo a cada tiempo (Figura 41). El modelo libre para todos los tiempos mostró valores de función objetiva menores que el de Emax fija, y esta diferencia se hizo más notable a mayor tiempo de incubación. El error aditivo también disminuyó a con el aumento del tiempo de incubación (Figura 41).

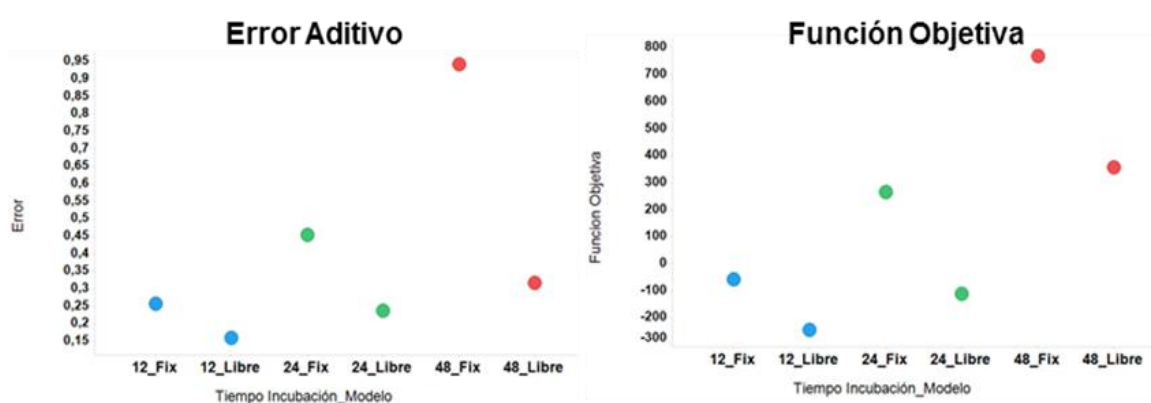


Figura 41 Representación gráfica del error aditivo de la función objetiva para cada modelo a cada tiempo de incubación

También se realizó la comparación de la calidad del ajuste del modelo, mediante la representación de los valores observados frente a los valores predichos por el modelo (Figura 42). En todos los casos el ajuste del modelo fue excelente, aunque se observó de nuevo que la correlación disminuía conforme el tiempo de incubación aumenta.

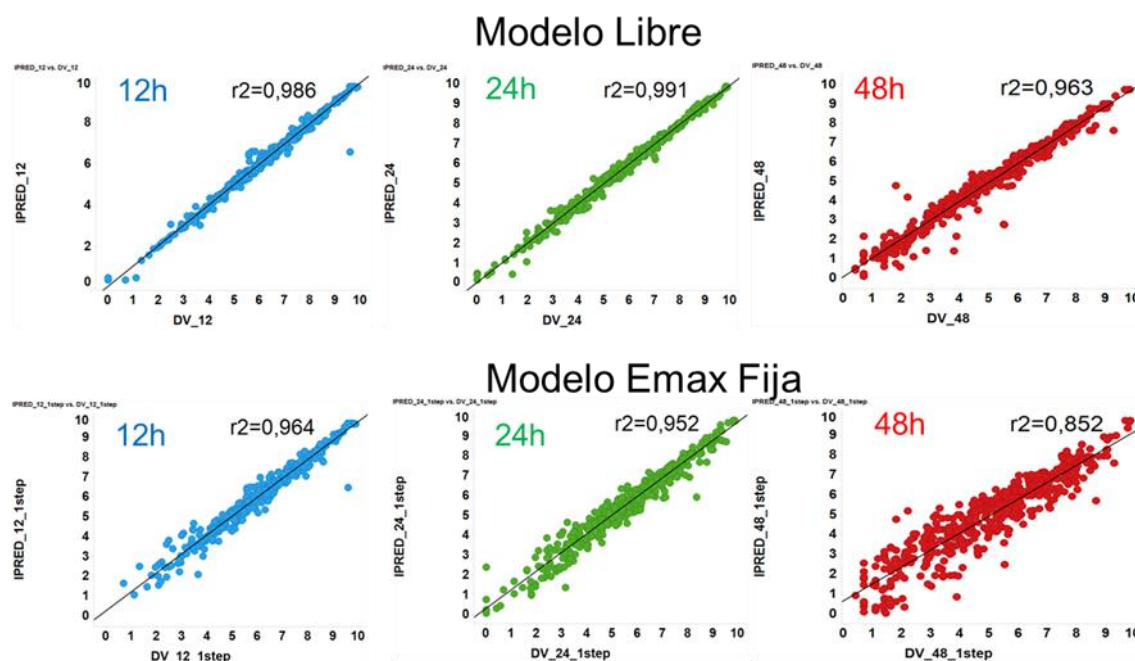


Figura 42 Representación gráfica de los valores predichos por el modelo (eje Y) frente a los valores observados (eje X) y coeficiente de regresión lineal

Adicionalmente se estudió el perfil farmacológico del Bortezomib a los 3 tiempos de incubación ensayados y aplicando el modelo libre en dos pacientes, uno resistente y otro sensible clínicamente al Bortezomib (Figura 43).

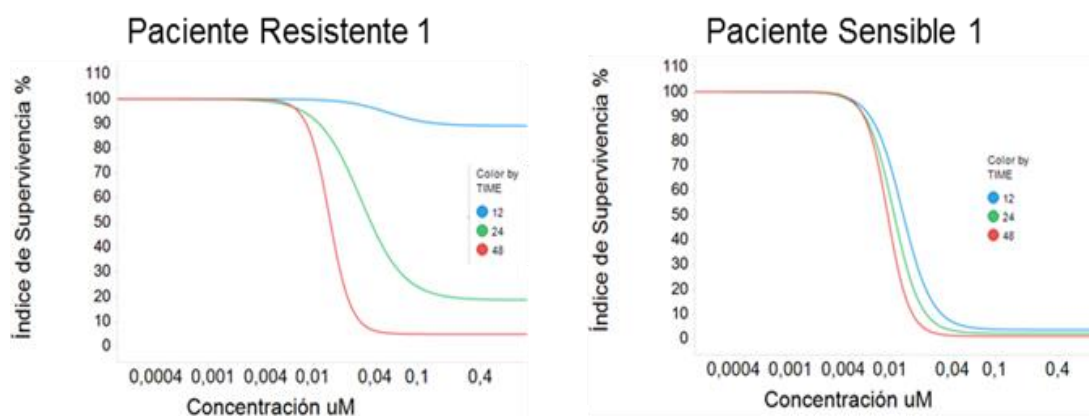


Figura 43 Perfil farmacológico de un paciente sensible y de otro resistente clínicamente al efecto del bortezomib a 12h, 24h y 48h de incubación, aplicando el modelo libre

En el caso del paciente clínicamente sensible, la sensibilidad ex vivo al Bortezomib se detectó claramente a cualquier tiempo de incubación. Sin embargo, el perfil del paciente resistente únicamente fue detectado ex vivo a un tiempo de incubación de 12h.

4.3.3 Construcción de los modelos farmacodinámicos

Para la construcción de los modelos farmacológicos ex vivo de las drogas ensayadas se utilizó el modelo Libre y el de Emax Fija (fijo) descritos en el apartado anterior “Estudio cinético del comportamiento ex vivo del Bortezomib”. Los parámetros poblacionales obtenidos para cada fármaco, así como su variabilidad inter paciente y el error relativo asociado a cada parámetro se muestran en la Tabla 18.

DROGA	MODELO	TIEMPO	N	Eficacia (E_{max})		Potencia (EC_{50})		VIP- E_{max}		VIP- EC_{50}	
				% Supervivencia		μM					
				Pob	ER	Pob	ER	Pob	ER	Pob	ER
BOR	LIBRE	12	127	12.8	2	0.05	8	2.79	13	0.453	18
BOR	EMAX FIJO	12	127	0	*	0.0891	?	*	*	2.38	4
CAR	LIBRE	12	58	0.1	0	0.0835	12	1.94	22	0.552	29
CAR	EMAX FIJO	12	58	0	*	0.0835	12	*	*	0.522	29
MEL	EMAX FIJO	48	231	0	*	32	7	*	*	0.603	12
BEN	EMAX FIJO	48	176	0	*	160	4	*	*	0.227	11
CICLO	EMAX FIJO	48	197	0	*	92.3	5	*	*	0.437	14
DEX	LIBRE	96	29	72.9	40	0.0286	37	3.26	69	0.678	147
DEX	EMAX FIJO	96	29	0	*	67.9	175	*	*	48.4	65
PRED	LIBRE	96	29	13.4	5	67.6	100	0.245	168	14.2	85
PRED	EMAX FIJO	96	29	0	*	197	109	*	*	19.6	67

Tabla 18 parámetros farmacodinámicos obtenidos para los fármacos testados. La tabla muestra tanto valores poblacionales de eficacia (E_{max}) y potencia (EC_{50}), como las variabilidades entre pacientes (VIP) asociadas a cada parámetro y su error residual (ER). * indica que ese valor no ha sido estimado por estar restringido el parámetro E_{max} en el modelo. BOR = Bortezomib; CAR= Carfilzomib; MEL= Melfalán; BEN= Bendamustina; CICLO= Ciclofosfamida; DEX= Dexametasona; PRED= Prednisona.

➤ Inhibidores de proteosoma

• Bortezomib:

El modelo se construyó a partir de 127 muestras de pacientes ensayadas a 12h (Figura 44). En vista de los datos de bondad de ajuste obtenidos para cada uno de los modelos, el que mostró mejores resultados fue el modelo libre. A pesar de que las diferencias en la precisión del ajuste no fueron muy significativas, el modelo libre se ajustó mejor a los datos experimentales. El modelo fijo mostró deficiencias en el ajuste cuando el número de células vivas en el ensayo fue bajo, hecho que ocurrió a mayores valores de concentración.

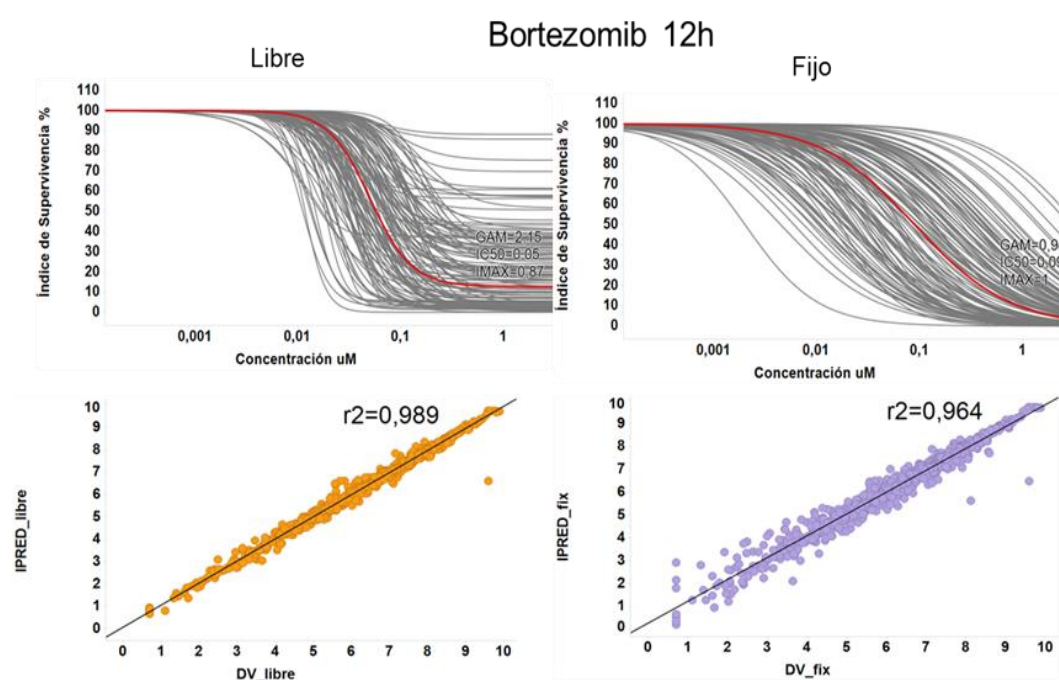


Figura 44 Modelos farmacodinámicos libre y de Emax fija ex vivo del bortezomib. Abajo, representación gráfica de la bondad del ajuste enfrentando los valores predichos por el modelo (eje Y) frente a los valores observados (eje X) y coeficiente de regresión lineal

- Carfilzomib:

El modelo se construyó a partir de 57 muestras de pacientes ensayadas a 12h (Figura 45). En este caso, la bondad del ajuste fue más parecida entre los dos modelos ya que el Carfilzomib fue capaz de eliminar la mayoría de las CP-MM a las dosis ensayadas más altas.

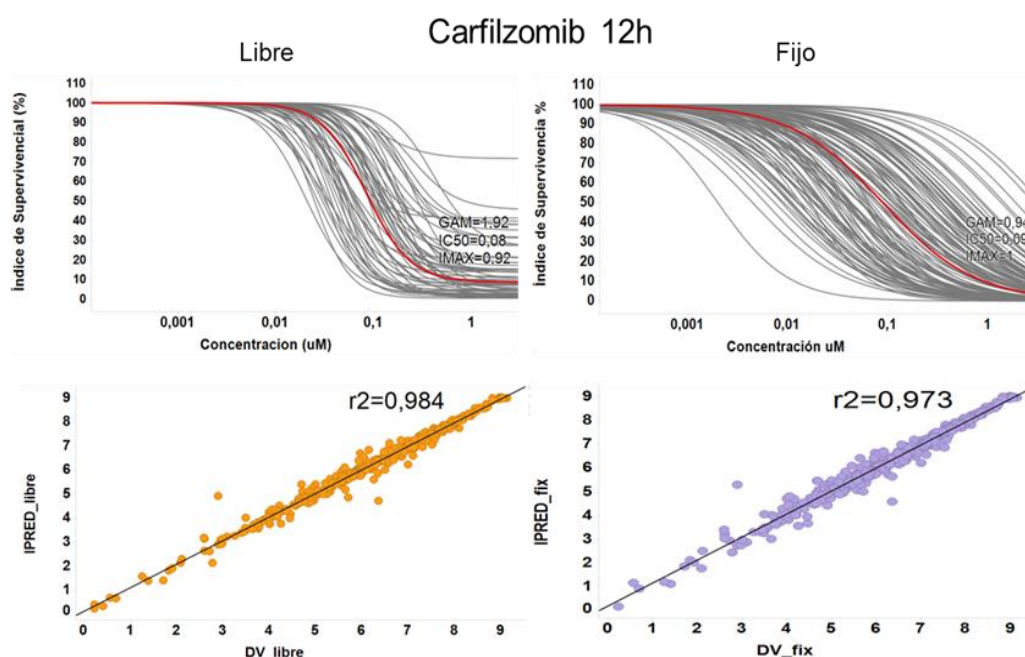


Figura 45 Modelos farmacodinámicos libre y de Emax fija ex vivo del Carfilzomib. Abajo, representación gráfica de la bondad del ajuste enfrentando los valores predichos por el modelo (eje Y) frente a los valores observados (eje X) y coeficiente de regresión lineal

➤ **Agentes metilantes: Melfalán, Bendamustina y Ciclofosfamida**

• **Melfalán:**

El modelo fue construido a partir de 231 muestras de pacientes ensayadas a 48h (Figura 46). Las diferencias entre el modelo libre y el de Emax fueron insignificantes debido a la alta eficacia del Melfalán a altas dosis que mostró una eliminación total de las células plasmáticas patológicas.

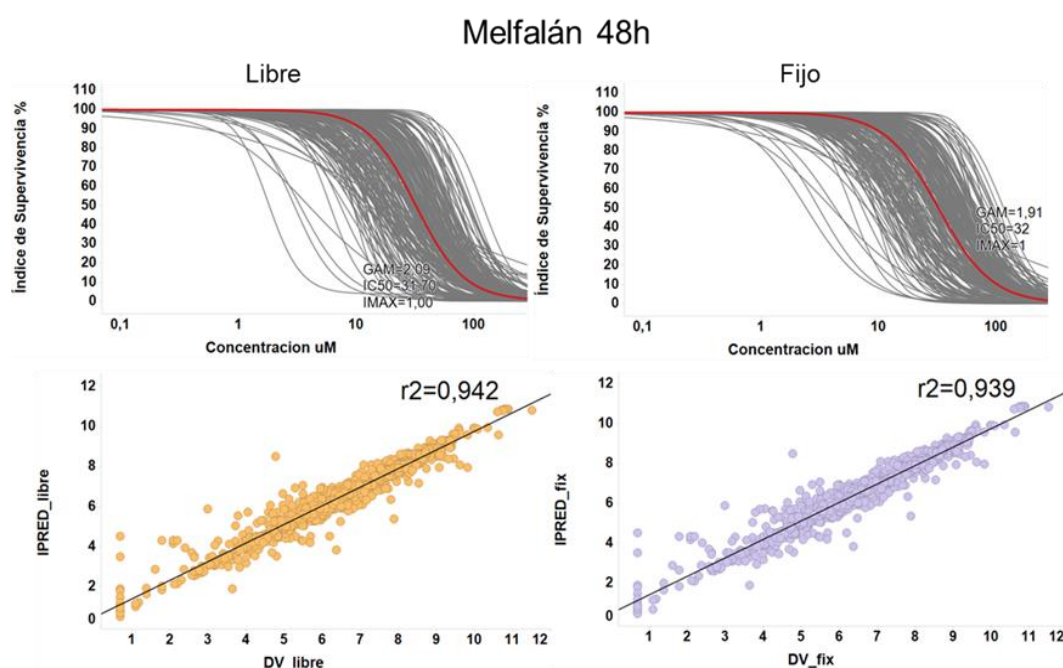


Figura 46 Modelos farmacodinámicos libre y de Emax fija ex vivo del Melfalán. Abajo, representación gráfica de la bondad del ajuste enfrentando los valores predichos por el modelo (eje Y) frente a los valores observados (eje X) y coeficiente de regresión lineal

• **Bendamustina:**

Los modelos fueron construidos a partir de 176 muestras de pacientes ensayadas a 48h (Figura 47). La pendiente (Gamma) que se obtuvo en el modelo libre fue tan alta que no presenta significado biológico.

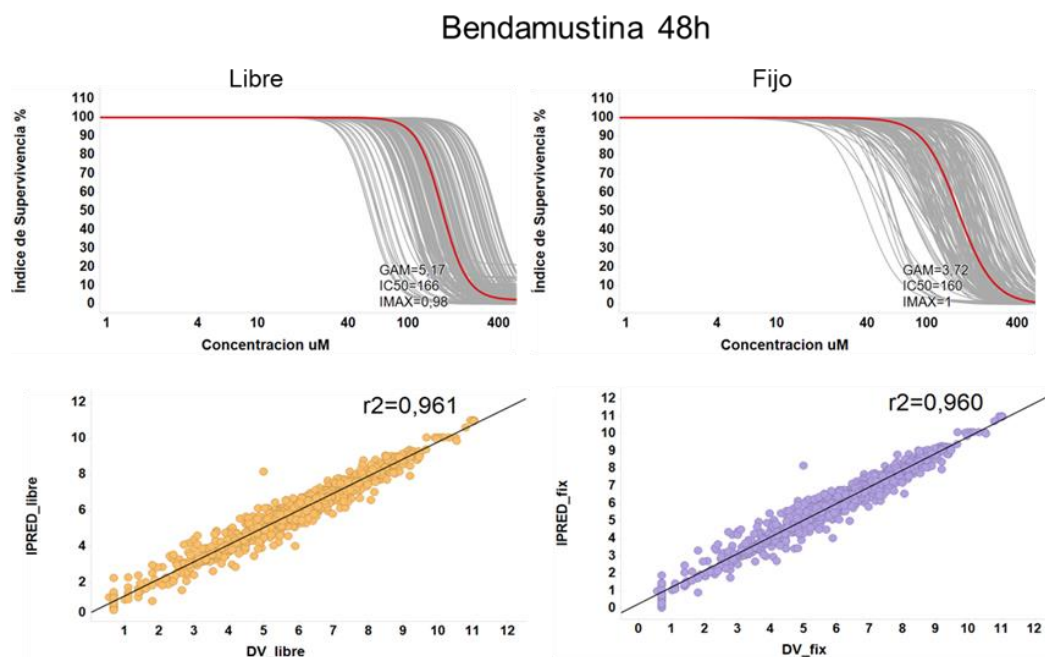


Figura 47 Modelos farmacodinámicos libre y de Emax fija ex vivo de la Bendamustina. Abajo, representación gráfica de la bondad del ajuste enfrentando los valores predichos por el modelo (eje Y) frente a los valores observados (eje X) y coeficiente de regresión lineal

- Ciclofosfamida

El modelo fue construido a partir de 197 muestras de pacientes ensayadas a 48h (Figura 48). Como ocurrió en el resto de los fármacos de su misma clase, no se detectaron diferencias entre el modelo libre y el de Emax fija.

Ciclofosfamida 48h

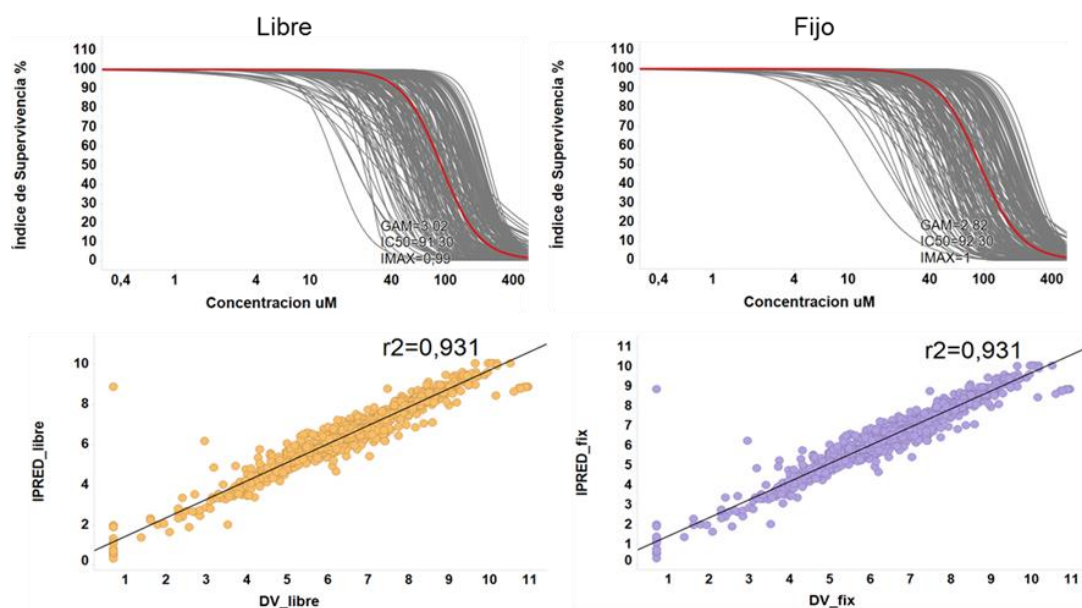


Figura 48 Modelos farmacodinámicos libre y de Emax fija ex vivo de la Ciclofosfamida. Abajo, representación gráfica de la bondad del ajuste enfrentando los valores predichos por el modelo (eje Y) frente a los valores observados (eje X) y coeficiente de regresión lineal.

➤ Glucocorticoides

El número de muestras ensayadas y empleadas en la construcción del modelo a cada tiempo se muestran en la Tabla 19.

Tiempo de Incubación	12h	24h	48h	72h	96h
Fármaco	Número de Muestras				
Dexametasona	33	71	205	125	29
Prednisona	40	74	229	131	29

Tabla 19 Número de muestras ensayadas para cada fármaco a cada tiempo de incubación

Ni la Dexametasona ni la Prednisona presentó efecto alguno a tiempos de incubación menores de 72 h. A tiempos mayores, como a 72h, la Dexametasona si mostró efecto sobre las células plasmáticas tumorales del 20 % de los pacientes incluso a bajas dosis.

Sin embargo, la Prednisona requirió de tiempos más largos para iniciar su actividad farmacológica. A 72h y aplicando el modelo de Emax fija los dos fármacos dieron error en la bondad del ajuste ya que los valores de EC50 se encontraban muy cercanos a los límites de confianza y no fue posible calcular el modelo con precisión. Sin embargo, a 96h los modelos sí convergieron y se detectó actividad en un 30 % de los pacientes ensayados, tanto para la Dexametasona como para la Prednisona (9/29).

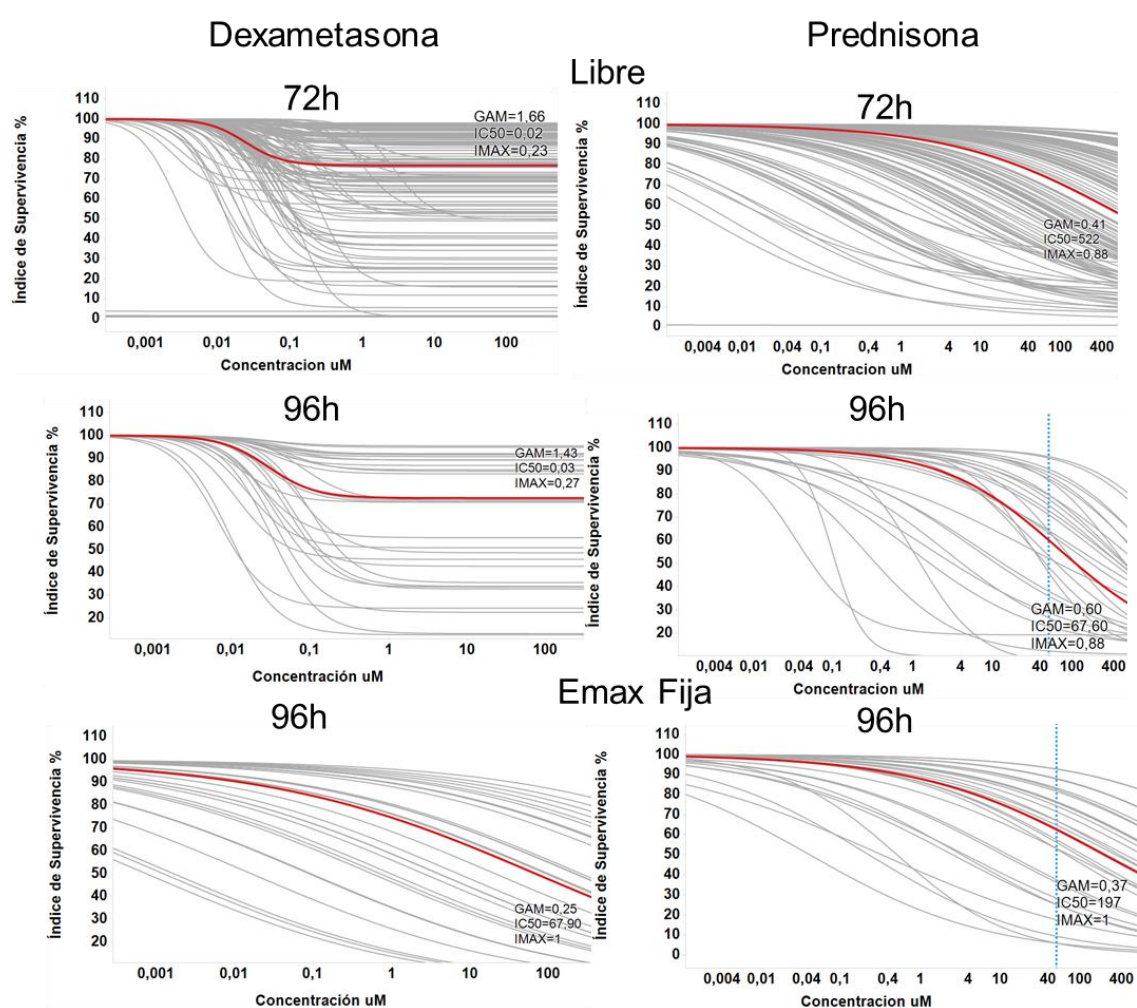


Figura 49 Modelos farmacodinámicos libre a 72 y 96h y de Emax fija a 96h de la Dexametasona y Prednisona

También se analizó el efecto que la presencia de estas dos drogas podría tener sobre la eficacia y potencia del Bortezomib, añadiendo una dosis constante de estos corticoides

a la monoterapia estándar del Bortezomib. El número de muestras testadas de cada combinación a cada tiempo de incubación se recogen en la Tabla 20.

Tiempo de Incubación	12h	24h	48h
Fármaco	Número de Muestras		
BOR+DEX	34	66	175
BOR+PRED	-	26	47

Tabla 20 Número de muestras ensayadas para cada combinación a cada tiempo de incubación. BOR = Bortezomib; DEX= Dexametasona y PRED = Prednisona.

La Figura 50 muestra la diferencia en % entre la actividad del Bortezomib en ausencia y en presencia de Dexametasona y Prednisona en términos de EC50. La línea horizontal en 0 marca el valor del EC50 del Bortezomib en monoterapia. Se encontró un mayor efecto anti-mieloma del Bortezomib en presencia de estos dos compuestos con respecto a los valores detectados en monoterapia, principalmente a 24 y 48h.

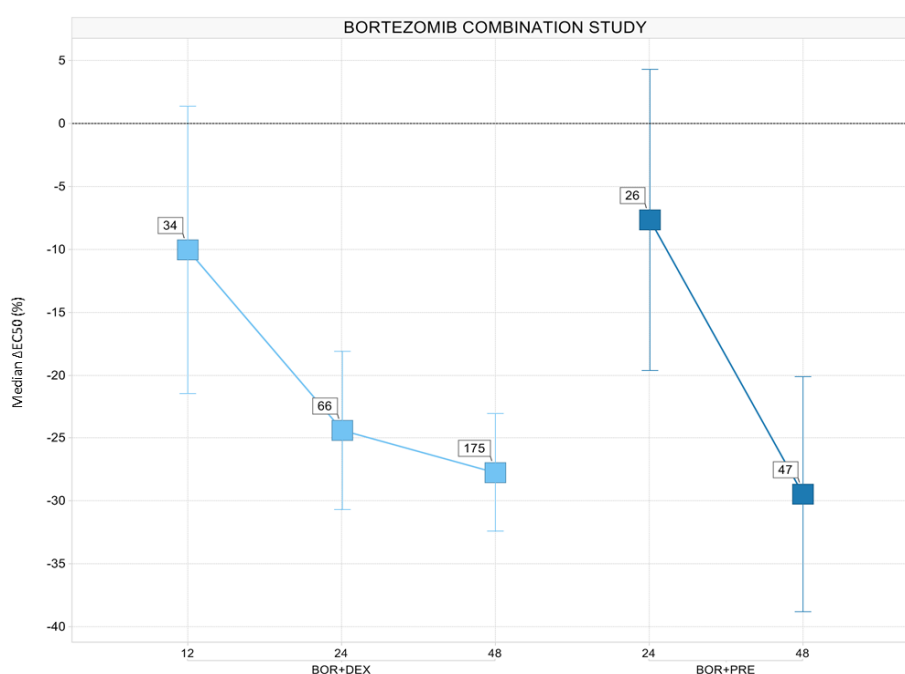


Figura 50 Potenciación del efecto del bortezomib en monoterapia cuando se añadió al medio de incubación 10 μ M de Dexametasona (DEX) y 10 μ M de Prednisona (PRED). En el eje Y se muestra la diferencia en % del valor de EC50 del bortezomib en monoterapia y en presencia de los corticoides. La línea horizontal en 0 marca el valor del EC50 del bortezomib en monoterapia.

➤ **Agentes inmunomoduladores**

Los 3 agentes inmunomoduladores ensayados fueron la Talidomida, Lenalidomida Y Pomalidomida. El número de muestras ensayadas para cada fármaco y a cada tiempo de incubación se muestran en la Tabla 21 .

Tiempo de Incubación	24h	48h	72h	96h
Fármaco	Número de Muestras			
Talidomida	23	173	42	13
Lenalidomida	21	174	34	12
Pomalidomida	17	161	20	15

Tabla 21 Número de muestras ensayadas para cada fármaco a cada tiempo de incubación

La construcción de los modelos poblacionales para estos fármacos no fue posible debido a su falta de actividad citotóxica en el ensayo de depleción en la mayoría de las muestras ensayadas, incluso a tiempos largos como 96h o a dosis altas como los 100 μ M. Sin embargo, sí fue posible capturar la actividad anti-proliferativa de la Lenalidomida y la Pomalidomida en un ensayo de proliferación diseñado específicamente para ello (apartado 3.3.2. Ensayo ex vivo). Se analizó su efecto anti-proliferativo en MO de pacientes con MM tras incubaciones de 96h. Se aplicó el mismo modelo farmacodinámico que en todos los ensayos anteriores, pero de manera individual y no poblacional debido a un insuficiente número de muestras ensayadas en estas nuevas condiciones. El número de muestras analizadas se muestra en la Tabla 22. Por motivos de disponibilidad de muestra no fue posible medir la actividad de estas drogas en el mismo paciente simultáneamente.

Fármaco	N muestras
Lenalidomida	11
Pomalidomida	6

Tabla 22 Número de muestras ensayadas para cada fármaco a cada tiempo de incubación.

Se encontró que el número de CP-MM que proliferaban disminuía con el aumento de la concentración del fármaco de una manera dosis-dependiente (Figura 51). Se detectó una gran variabilidad en la actividad anti-proliferativa de la Lenalidomida a lo largo de las 11 muestras de pacientes ensayadas, encontrándose casos donde se alcanzó inhibición total de la proliferación (muestra 002 y 007), mientras que en otros fue leve o nula (muestra 001, 006 y 008). Comparando la actividad de la Lenalidomida sobre la población de CP-MM proliferativa y no proliferativa se encontró que el efecto sobre la primera requería de dosis más bajas, mostrando mayor potencia (menor EC50) y mayor eficacia (menor Emax) en todos los casos menos uno (muestra 008). La capacidad de inducir muerte celular ex vivo de la Lenalidomida de nuevo fue limitada, siendo representada por la actividad sobre la población de CP-MM no proliferativa (azul). Las muestras 001 y 008 fueron resistentes tanto al efecto citotóxico como anti-proliferativo de la Lenalidomida, mientras que la muestra 009 únicamente se mostró resistente a la actividad citotóxica, siendo sensible a la inhibición de la proliferación a dosis crecientes del fármaco.

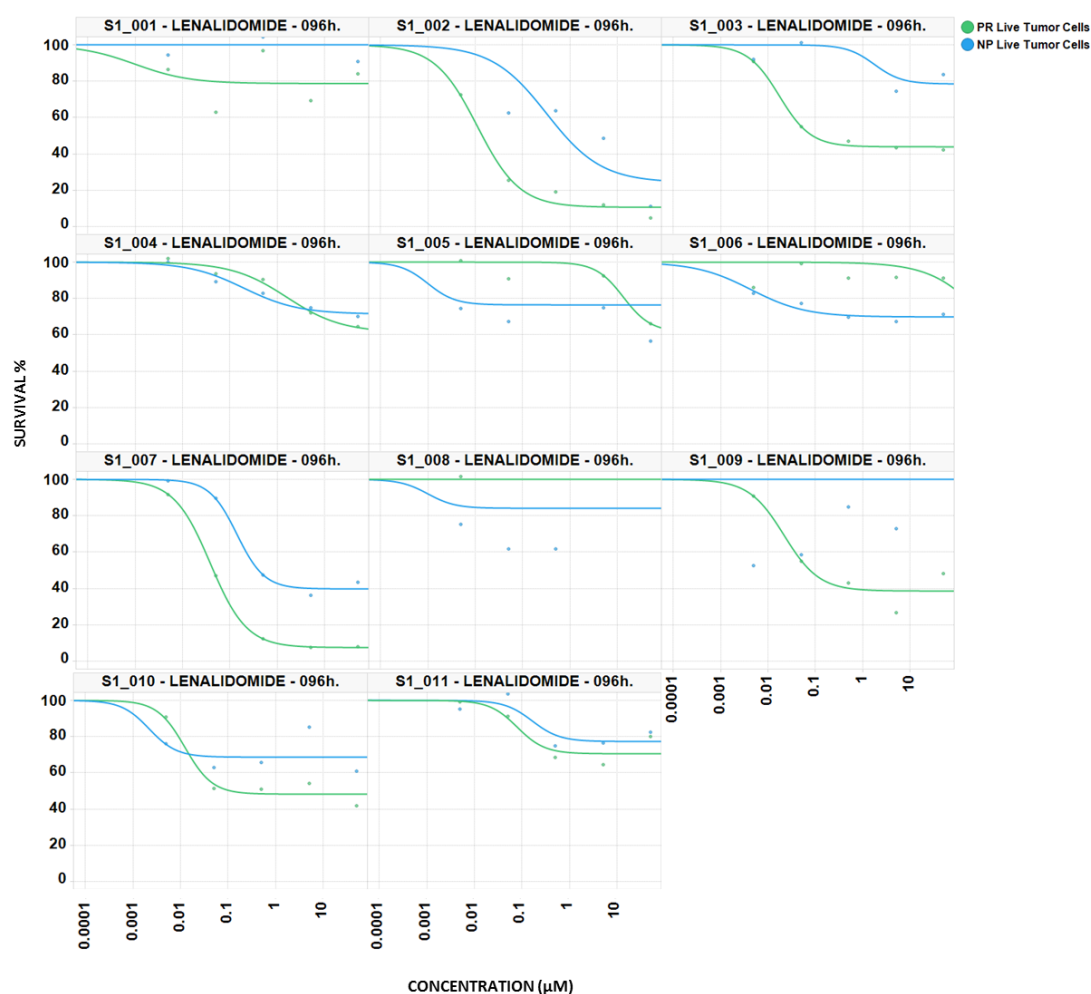


Figura 51 Dosis respuesta individuales obtenidas tras incubar con Lenalidomida 96h, coloreadas en función de la población de CP-MM, verde las CP-MM proliferativas y azul las CP-MM no proliferativas.

Respecto a la Pomalidomida, se encontró un patrón de actividad similar al de Lenalidomida, detectándose inhibición de la proliferación a dosis más bajas que a las que se detectó muerte celular en todos los casos ensayados. Curiosamente, la capacidad de la Pomalidomida para inducir muerte celular fue prácticamente nula en los 6 pacientes ensayados, llegándose incluso a detectar aumento en la población de células no proliferativas como consecuencia de la inhibición de células proliferativas al aumentar la dosis (muestra 006 y 008). Este comportamiento es característico de fármacos puramente anti-proliferativos, capaces de actuar sobre células que proliferan

e inhibir este proceso, pero no siendo capaz de inducir su muerte posteriormente, pasando de ser células proliferadas (hijas) a no proliferadas (madre) aún vivas en el cultivo.

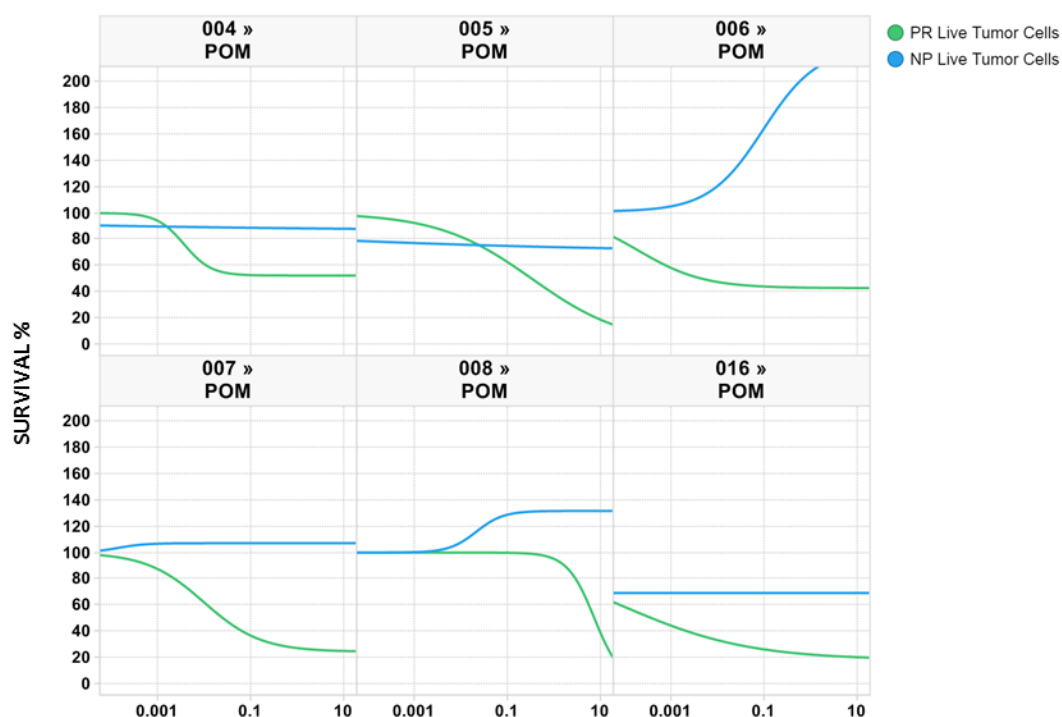


Figura 52 Dosis respuesta individuales obtenidas tras incubar con Pomalidomida 96h, coloreadas en función de la población de CP-MM, verde las CP-MM proliferativas y azul las CP-MM no proliferativas.

Todas las muestras mostraron que las células que no proliferan no eran sensibles a la acción de esta droga, presentando en alguno casos comportamiento puramente anti-proliferativo, como en la muestra 006 y 008.

Dado que no se pudieron ensayar estas dos drogas sobre la misma muestra de paciente, la comparación directa de su eficacia no pudo realizarse. Sin embargo, la comparación de sus parámetros farmacodinámicos medios obtenidos de las muestras ensayadas indicó que Pomalidomida presentó valores superiores tanto de potencia como de eficacia, en términos de inhibición de la proliferación (Tabla 23).

Población PR	EC50 (μ M)	E _{max} (%)
Lenalidomida	0.038	59.5
Pomalidomida	0.006	21.5

Tabla 23 Valores de EC50 y E_{max} medios (mediana) obtenidos de los ensayos de proliferación con Lenalidomida y Pomalidomida en 11 y 6 muestras primarias de pacientes, respectivamente.

4.3.4 Aplicación del cálculo AUC: comparación entre fármacos

Una vez contruidos los modelos farmacológicos y seleccionado el que mejor captura el comportamiento ex vivo de cada fármaco, se llevó a cabo el cálculo normalizado del AUC, tal y como se indicó en el apartado 3.3.3 “Cálculo del área bajo la curva (AUC)” de Materiales y métodos. Este parámetro permitió comparar las sensibilidades que presentan los pacientes a cada tratamiento:

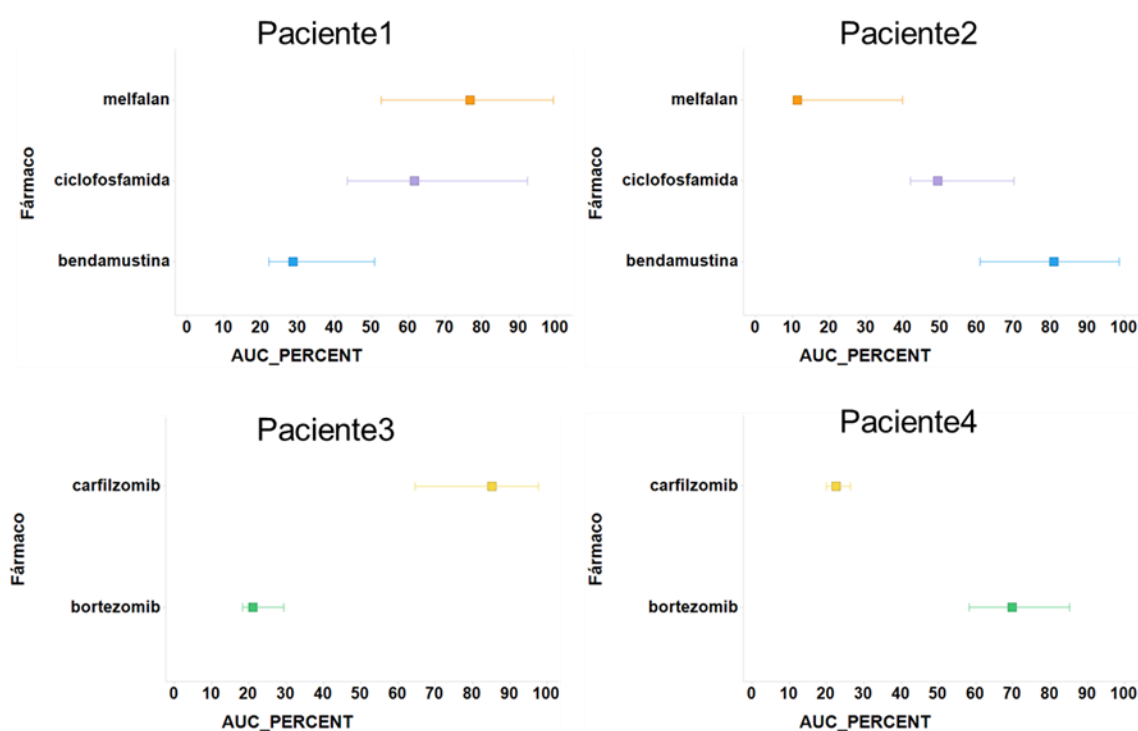


Figura 53 Percentil de AUC individuales de las combinaciones de fármacos ensayados en monoterapia. La barra de error corresponde con el intervalo de confianza calculado en las simulaciones. Menor AUC indica mayor sensibilidad ex vivo al fármaco.

Paciente 1: En este paciente se ensayaron los 3 agentes alquilantes estudiados. Como puede observarse, presenta un AUC menor en el caso de la Bendamustina y mayor en la Ciclofosfamida y Melfalán (Figura 53). Por lo tanto, si hubiera que decidir que tratamiento administrar a este paciente, según los resultados obtenidos de los perfiles farmacológicos ex vivo sería más recomendable uno que incluyera Bendamustina que Ciclofosfamida o Melfalán.

Paciente 2: En este paciente también se ensayaron los 3 agentes alquilantes (Figura 53). Presentó mayor sensibilidad ex vivo al Melfalán que a la Ciclofosfamida y mucho más que a la Bendamustina, a la cual se mostró bastante resistente ex vivo. Esto podría indicar que la administración de un tratamiento que incluyera Melfalán como agente alquilante en lugar de los otros dos compuestos sería más recomendable.

Paciente 3: En este paciente se testaron los dos inhibidores del proteosoma (Figura 53). Se encontró que este paciente presentó una mayor sensibilidad ex vivo al Bortezomib que al Carfilzomib, por lo que un tratamiento que incluyera el Bortezomib podría ser más conveniente para este paciente de acuerdo al test de sensibilidad ex vivo.

Paciente 4: En este paciente también se testaron los dos inhibidores del proteosoma (Figura 53). Contrariamente a lo observado en el paciente 3, este paciente presentó una mayor sensibilidad al Carfilzomib que al Bortezomib, por lo que un tratamiento basado en Carfilzomib entre otras familias de fármaco podría ser más recomendable que con Bortezomib de acuerdo al resultado del test.

4.3.5 Aplicación de los modelos farmacodinámicos: asociación entre la respuesta ex vivo y la respuesta clínica al Bortezomib.

Se evaluó la existencia de alguna asociación entre la respuesta farmacológica obtenida a partir de ensayos ex vivo al Bortezomib y la respuesta clínica de los pacientes. De las 127 muestras de pacientes en las se ensayó la actividad ex vivo del Bortezomib a 12h, el 54% correspondían a pacientes en 1ª línea, 13% en 2ª Línea y el resto (34%) a pacientes en 3 línea o superior (Figura 54.A).

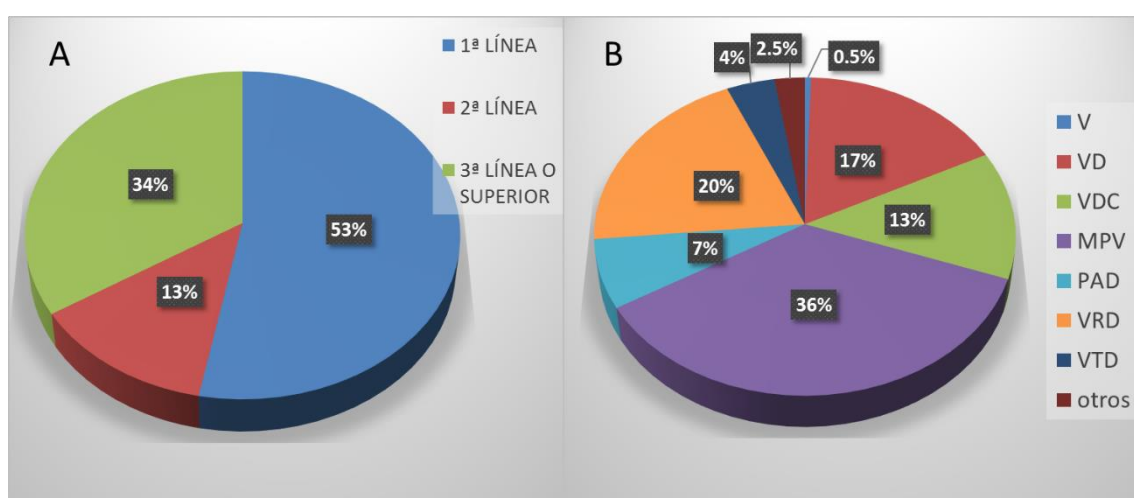


Figura 54 Gráficos de sectores mostrando datos estadísticos de los pacientes incluidos en la construcción del perfil farmacológico del Bortezomib. A) Porcentajes de pacientes en cada línea de tratamiento del total de los 127. B) Tratamientos recibidos por los 45 pacientes que recibieron al menos Bortezomib como tratamiento inmediatamente superior a la extracción de la muestra.

De los 127 pacientes incluidos en el modelo del Bortezomib, solo 45 de ellos resultaron haber recibido Bortezomib en el esquema de tratamiento inmediatamente posterior a la extracción de la muestra de MO (Figura 54.B). Como era de esperar, los tratamientos administrados a estos pacientes en su mayoría incluyeron 2 o más fármacos además del Bortezomib. La respuesta clínica fue monitorizada y clasificada en 5 niveles: refractariedad (RR), enfermedad estable (EE), respuesta parcial (RP), muy buena

respuesta parcial (MBRP) y respuesta completa (RC). Para la evaluación de la correlación se consideró RP, MBRP y RC como respuesta clínica positiva y RR y EE como ausencia de respuesta.

Por otro lado, la respuesta ex vivo se expresó en términos de AUC, que integra valores de potencia y eficacia, de manera que a menor AUC mayor actividad del fármaco. (ver apartado “3.3.3 Cálculo del área bajo la curva” de Materiales y métodos. Como límites de actividad se consideraron sensibles aquellos pacientes con AUC por debajo del percentil 30 (P30) y resistentes a pacientes con AUC por encima del percentil 70 (P70).

Con estas categorías se realizó la prueba estadística ANOVA, siendo la variable continua el valor de AUC y la categórica la respuesta clínica. No se encontró asociación significativa entre la respuesta clínica y la respuesta ex vivo.

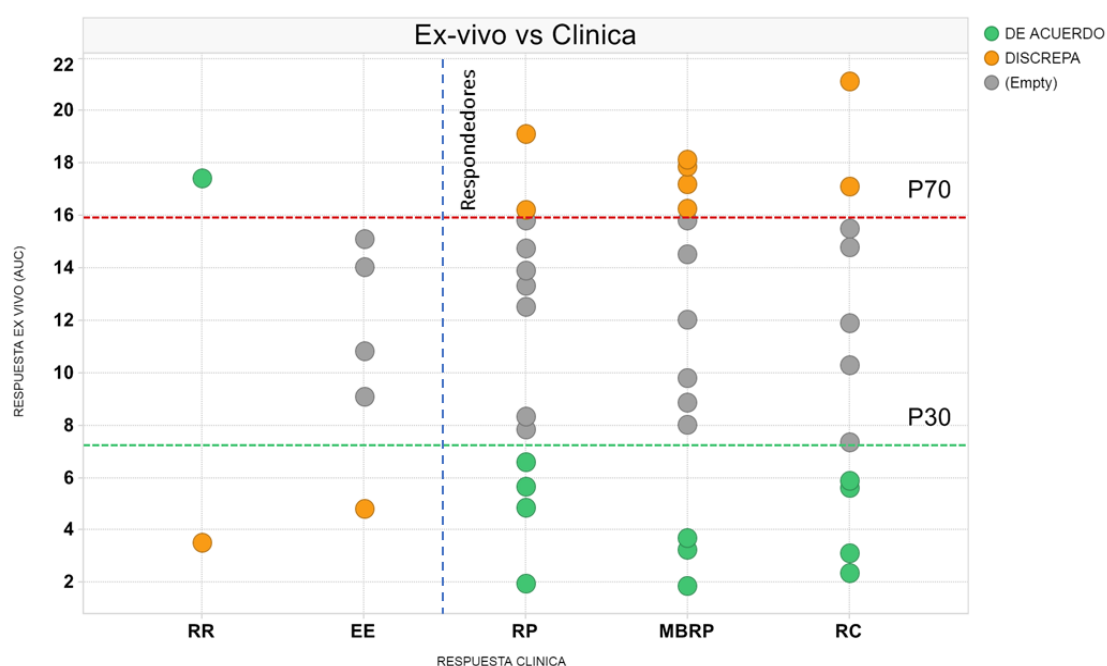


Figura 55 Representación de la respuesta clínica (X) de los 45 pacientes ensayados que recibieron bortezomib tras el envío de la muestra frente a la respuesta ex vivo en términos de AUC (Y). Las líneas de puntos delimitan los percentiles más extremos, sensibles en verde (P30) resistente en rojo (P70), obtenidos del modelo libre del bortezomib en monoterapia, considerando los 127 pacientes ensayados. Los puntos grises corresponden a pacientes con una sensibilidad ex vivo intermedia, mientras que los coloreados corresponden a pacientes con sensibilidades más extremas, siendo verdes aquellos donde la respuesta ex vivo coincide con la respuesta clínica y en naranja donde discrepan.

Sin embargo, sí se detectó una asociación entre los pacientes que son clasificados como sensibles ex vivo con su respuesta clínica, de manera que de los 13 pacientes sensibles ex vivo (con valores de AUC por debajo del P30), 11 de ellos fueron sensibles clínicamente (85%).

Agrupando los tratamientos recibidos por los pacientes en función de si el Bortezomib se administró en monoterapia (morado) o junto a un IMiD (amarillo) se encontró que ninguno de los pacientes donde la respuesta ex vivo del Bortezomib coincidió con la respuesta clínica había recibido un IMiD simultáneamente. Contrariamente, 5 de los 7 pacientes que alcanzaron RC pero cuya respuesta ex vivo al Bortezomib no fue de sensibilidad habían recibido un IMiD en su esquema de tratamiento (Figura 56).

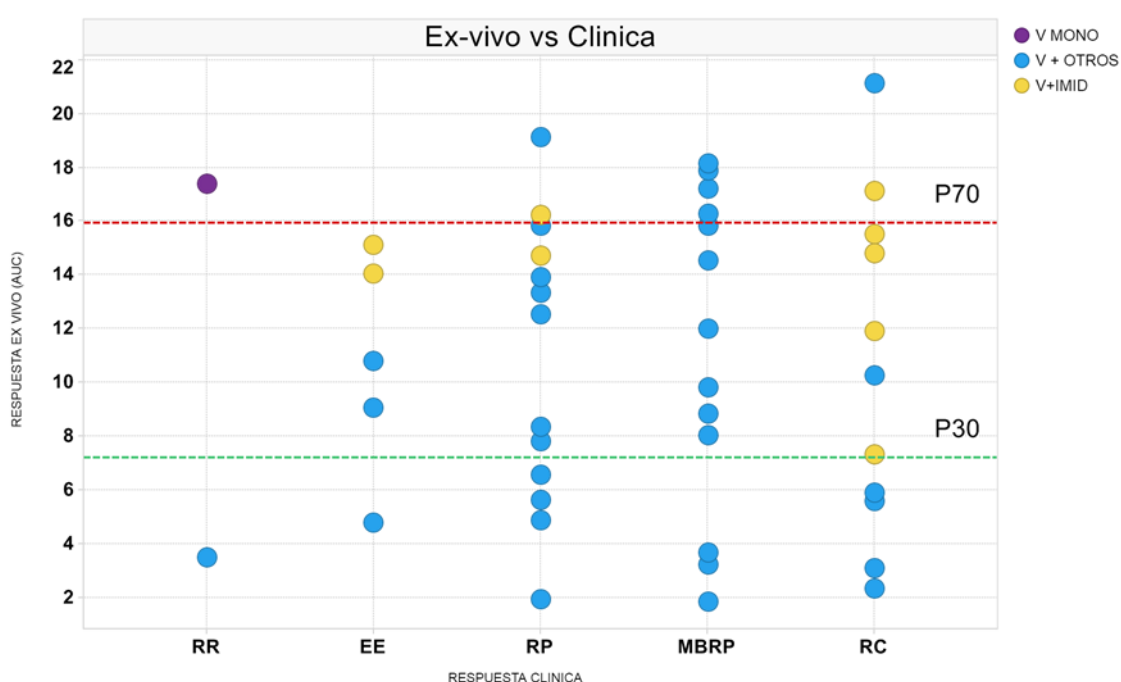


Figura 56 Representación de la respuesta clínica (X) de los 45 pacientes ensayados que recibieron bortezomib tras el envío de la muestra frente a la respuesta ex vivo en términos de AUC (Y). Las líneas de puntos delimitan los percentiles más extremos, sensibles en verde (P30) resistente en rojo (P70), obtenidos del modelo libre del bortezomib en monoterapia y considerando los 127 pacientes ensayados. El color de los puntos indica el tipo de tratamiento recibido por los pacientes tras la extracción de la muestra, siendo morado en el caso de recibir BOR exclusivamente, amarillo en los casos donde el BOR fue administrado junto con un IMiD, y azul cuando BOR se administró con cualquiera del resto de drogas comúnmente empleadas.

5.- DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 ESTRATEGIA BASADA EN ENSAYOS MOELCULARES

5.1.1 *Estudio del ADN nuclear*

La frecuencia mutacional de los genes y las rutas más frecuentemente alterados en este estudio fueron consistentes con los valores publicados previamente por otros autores (127,128) (*KRAS* 21 vs 21%, *NRAS* 18 vs 16%, *BRAF* 7 vs 8% and *TP53* 8 vs 8%). Sin embargo, la incidencia mutacional de *DIS3* detectada en nuestra cohorte fue ligeramente superior a la descrita anteriormente, aumentando del 9 al 19% de los pacientes. La causa más probable de este incremento es la profundidad de lectura aplicada, 1600x frente a 500x de publicaciones previas (127,175). La alta profundidad de lectura permitió la detección fiable de mutaciones por debajo el 10% de FA que fueron probablemente descartadas por falta de cobertura en otros trabajos. Dado que *DIS3* fue el gen en el que se detectó un mayor número de mutaciones subclones con FA inferiores al 10% la diferencia fue más significativa.

La detección de mutaciones subclonales con FA inferiores al 10% permitió la identificación de un subgrupo de pacientes con peor pronóstico, los cuales acumulaban un número de mutaciones mayor de 3. El 30 % de las mutaciones de este subgrupo presentó FA por debajo del 10%, de manera que aplicando la profundidad de lectura convencional no hubiera sido posible su identificación. Kortum et al empleó una estrategia de secuenciación dirigida utilizando el mismo panel de genes aunque aplicando profundidades de lectura ligeramente inferiores (128). También reportó un incremento del número de mutaciones subclonales comparado con estudios en los que

se utilizó secuenciación de exoma o genoma completo, confirmando también que las mutaciones a bajas FA estaban siendo ignoradas por limitaciones de la metodología experimental.

Respecto a las mutaciones encontradas en los genes relacionados con la ruta de señalización RAS, se encontró que mutaciones en *KRAS* y *NRAS* no coexisten dentro del mismo clon tumoral en ningún paciente estudiado, ni a nivel clonal ni subclonal, tal y como ya se había reportado anteriormente (176,177). Sin embargo, si se identificó 3 pacientes con mutaciones coexistentes en los genes *KRAS* y *BRAF*. La FA para estas mutaciones fue del 26% y 27%; del 7% y 42% y del 3% y 13% para *BRAF* y *KRAS*, respectivamente, lo que indica que mutaciones en estos dos genes si aparecen a nivel subclonal dentro del mismo tumor. Además, que la FA detectada para las mutaciones en *KRAS* esté por debajo del 50% en todos los pacientes apoya la hipótesis de que los tumores de pacientes que no han sido expuestos a la presión selectiva de una terapia presentan estas mutaciones en clones minoritarios, mientras que en pacientes en recaída y expuestos a un tratamiento aparecen en clones mayoritarios (176).

Las mutaciones en el gen *DIS3* han sido recientemente descritas como alteraciones genéticas recurrentes en pacientes con MM (127,176,178,179). La gran mayoría de las mutaciones descritas en este estudio fueron detectadas en los dominios PIN y RBN (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), los cuales son esenciales para la unión del magnesio con el sitio activo de la proteína en el caso de PIN y para la actividad exonucleolítica en el caso de RBN. Las mutaciones D487H (n = 2) and R780T (n = 2) fueron las más comunes en nuestro cohorte, las cuales han sido ya identificadas como variantes patológicas y definidas como mutaciones hotspots del gen *DIS3* (178,179). En este trabajo, además, se han reportado nuevas mutaciones que no han sido descritas

anteriormente, señalando nuevos posibles hotspots que deberán tenerse en cuenta en estudios posteriores.

Respecto al perfil citogenético de los pacientes incluidos en este estudio, numerosas publicaciones ya destacaron la relación que existe entre la presencia de marcadores de alto riesgo como la $t(4;14)$, $t(11;6)$, $del17p$ y ganancia 1q y un pronóstico desfavorable (43,46). Sin embargo, la aparición de tratamientos de última generación con nuevos mecanismos de acción, como los inhibidores de proteosoma o los inmunomoduladores, podría alterar el impacto pronóstico descrito anteriormente para estas alteraciones citogenéticas, y, por tanto, sería necesario una reevaluación de su impacto pronóstico. En el caso de terapias basadas en Bortezomib, se ha observado que esta droga mejora ligeramente el ratio y la profundidad de respuesta de pacientes con la translocación $t(4;14)$ o la ganancia 1q21(97,180,181). Además, los trasplantes autólogos de células madres también parecen mejorar el pronóstico deficiente de estas alteraciones (46). En este trabajo a pesar de que no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de alteraciones de alto riesgo citogenético con la supervivencia, si se observó una tendencia hacia SLP más cortas en pacientes con dichas aberraciones. Esto puede deberse a que estas alteraciones se producen en el 10-20% de los pacientes y, por tanto, no se dispone de un número de pacientes lo suficientemente grande para detectar su impacto.

El estudio de correlación llevado a cabo entre alteraciones citogenéticas y genes mutados detectó algunas correlaciones significativas, como las mutaciones en *DIS3* y *NRAS* con la translocación $t(4;14)$, o mutaciones en *TP53* con la translocación $t(11;14)$. Sin embargo, otros autores publicaron la presencia de correlación entre mutaciones en *KRAS*, *IRF4* y *CCND1* con la translocación $t(11;14)$ o *FGFR3* con $t(4;14)$ (127), las cuales

no han sido detectadas en este trabajo en parte debido la baja recurrencia mutacional de algunos de los genes anteriores y también por el bajo número de casos estudiados. Este tipo de estudios en cohortes mayores permitirían extraer conclusiones muy valiosas que podría suponer un gran avance hacia la introducción de protocolos de medicina personalizada en la rutina clínica basados en estudios de secuenciación profunda dirigida. Estos estudios permitirían reemplazar antiguos métodos citogenéticos por nuevas tecnologías más sofisticadas, sensibles y versátiles, mejorando así la capacidad de respuesta de los clínicos y la selección del mejor seguimiento y tratamiento para cada paciente.

TP53 fue el único gen con impacto significativo en la supervivencia de los pacientes, tanto en la SLP como en la OS (Figura 31). Su influencia sobre el pronóstico de los pacientes y la respuesta al tratamiento fue tan negativa, que a pesar de su baja recurrencia mutacional (7/79, 9% de los pacientes) y de que los pacientes bajo este ensayo clínico recibieron tratamientos altamente eficientes (157), su impacto en la supervivencia fue claramente detectable. Por tanto, sería necesario realizar esfuerzos adicionales en la búsqueda de terapias más efectivas para pacientes con esta alteración que permitan contrarrestar el fatal pronóstico que les confiera.

Por otro lado, solo 1 de los 7 pacientes con mutaciones en *TP53* presentó simultáneamente del(17p). Existen varios estudios en la literatura donde se evaluó esta asociación, el primero de ellos fue publicado por Laurence Lodé et al en 2010, donde estudiaron 92 muestras de pacientes con MMnd, 54 de ellos con la delección 17p (182). Encontraron que el 37 % de los pacientes con la delección presentaban también mutaciones en el gen *TP53*. Dado que el porcentaje de pacientes con del(17) fue del 50%, muy superior al 10% de media reportado en la bibliografía, podrían haber

sobreestimando el número de pacientes del(17) positivos estableciendo un umbral de positividad más bajo de lo habitual y sobreestimando el porcentaje de pacientes del(17) y *TP53* positivos. Otro estudio más reciente publicado por Chin et al en 2017 estudió las mutaciones en *TP53* en un total de 286 muestras de pacientes con MM (183). Concluyeron que del total de los pacientes con del(17), el 35% presentaban además mutaciones en el gen *TP53*, pero entre estos pacientes solo el 25% eran pacientes con MMnd, por lo que los datos corresponden mayoritariamente a muestras de MM en recaída, sobrestimando así el porcentaje de pacientes del(17) positivos con mutaciones en *TP53* en MMnd. Teniendo en cuenta datos obtenidos por estudios en los que se empleó NGS para detectar mutaciones en *TP53*, Walker et al publicó en 2015 un estudio de 463 muestras de MMnd en el que el 11% presentaban alteraciones de P53: el 9% positivos para la del(17p) y el 3% con mutaciones en *TP53* (127). De esta manera, solo un 1.5% de pacientes mostraron las dos alteraciones genéticas simultáneamente. Otro estudio publicado por Kortum et al en 2015 estudió 72 muestras de pacientes con MMnd, todos positivos para la del(17p) por FISH y donde el 20% de los pacientes presentaron alguna mutación en el gen *TP53* (184). El último estudio publicado hasta la fecha donde se evaluó las mutaciones en *TP53* en pacientes de MMnd con datos citogenéticos disponibles fue el llevado a cabo por Kortum et al en 2016, el cual reveló que de los 142 pacientes estudiados, el 14,78% era del(17p) positivos y en 9% tenían *TP53* mutado, sin hacer siquiera mención al número de casos en los que estas dos alteraciones genéticas ocurrían simultáneamente (128). En este trabajo se encontró que el 10% de los pacientes presentaban la del(17p) y que un 14% de los pacientes con esta alteración presentaron mutaciones en *TP53*. Por tanto, trasladando las proporciones anteriormente señaladas a este trabajo, se esperaría encontrar 1 o 2 pacientes con las

dos aberraciones simultáneamente, por lo que el impacto de la pérdida de un solo paciente del(17p) positivo podría explicar las diferencias con los datos previamente publicados. Además, estos resultados apuntan a que el estudio de este gen por FISH está bastante limitado, existiendo casos en los que las mutaciones no van acompañadas de deleciones y, por tanto, un subgrupo de pacientes con un pronóstico muy desfavorable no está siendo correctamente identificados al diagnóstico.

Recientemente se ha identificado Cereblon como ruta esencial en la actividad anti-mieloma de drogas inmunomoduladoras como la Talidomida, Lenalidomida O Pomalidomida (116,185–187). En los últimos 3 años se han reportado varios estudios que señalan que Cereblon es la diana de estas drogas, y por tanto, alteraciones de este gen o de otros pertenecientes a su cascada de señalización confieren resistencia a la actividad anti-mieloma de los IMiDs (185,186). En este trabajo, se ha encontrado que pacientes con mutaciones puntuales no sinónimas en algunos de los genes relacionados con la ruta Cereblon (*IRF4*, *CUL4A*, *CUL4B*, *IKZF3* y *MYC*) presentaron tiempos de recaída y de muerte significativamente más cortos que el resto. Dado que todos ellos fueron tratados con Lenalidomida bajo el esquema de tratamiento del ensayo clínico GEM10 y, además, es una cohorte de pacientes muy homogéneo y uniforme, estos resultados suponen una confirmación clara de que pacientes con alteraciones en esta ruta metabólica muestran resistencia a la acción farmacológica de estas drogas y, por tanto, no deberían incluirse en su esquema de tratamiento.

En resumen, este trabajo es el primer estudio prospectivo en el que se emplea la secuenciación profunda dirigida en un conjunto de pacientes de nuevo diagnóstico tan homogéneo. A pesar del limitado número de pacientes estudiados, esta estrategia de

NGS es capaz de detectar mutaciones en las CP-MM de la mayoría de los pacientes, permitiendo la identificación de subgrupos de pacientes con pronóstico desfavorable que no habrían sido identificados por su perfil citogenético o sus datos clínicos al diagnóstico. El bajo requerimiento de muestra y el asequible coste experimental y computacional hacen de esta estrategia una excelente oportunidad para introducir protocolos de medicina personalizada en la rutina clínica y además, intensificar la búsqueda de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas que permitan mejorar la selección del tratamiento y la supervivencia de los enfermos de MM.

5.1.2 Estudio del ADN mitocondrial

En este trabajo se describe por primera vez el estado del NC de ADNmt en CP-MM correspondiente a pacientes en distintos estadios de la enfermedad. Los resultados obtenidos a partir del análisis de 139 muestras por RT-PCR indicaron que existe un aumento en el NC de ADNmt en las CP-MM con respecto a las CP de pacientes sanos (Figura 32). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el NC de ADNmt entre los distintos estadios del MM, observándose una amplia variabilidad en el NC de ADNmt entre los pacientes de un mismo estadio. Esto podría indicar que la transformación de la CP implicaría una ganancia de contenido mitocondrial pero que ésta podría alcanzarse mayoritariamente ya en el primer estadio asintomático de la enfermedad, en la GMSI y, por tanto, no observarse diferencias significativas en el NC de ADNmt de los estadios posteriores más avanzados.

La variabilidad en el NC de ADNmt en pacientes con MMnd y la disponibilidad de datos clínicos permitió la evaluación del impacto de esta variable en la supervivencia de 69 de los 78 pacientes. Se encontró que altos valores en el NC de ADNmt conferían un peor pronóstico, encontrándose SLP significativamente más cortas en pacientes con un

NC mayor de 400((21.6 vs 29.4 meses. [HR] 3.78; 95% [CI] 1.49-9.63, $P = 0.005$) (Figura 33). Además, el estudio del contenido mitocondrial en las CP-MM de recaídas consecutivas del mismo paciente mostró que en 18 de los 21 pacientes estudiados se producía un aumento en el contenido mitocondrial con la progresión de la enfermedad (Figura 36). Estos resultados parecen indicar que además de poder tener cierta implicación en la transformación de la CP, el contenido mitocondrial podría conferir a la CP-MM cierta ventaja para sobrevivir al efecto antineoplásico del tratamiento o disminuir su eficacia, viéndose reflejado en tiempos de recaídas inferiores y en un aumento progresivo del contenido mitocondrial con la adquisición del fenotipo refractario que tiene lugar tras los consecutivos tratamientos. Estudios previos ya habían reportado que células tumorales con mayor contenido mitocondrial presentaban una mayor capacidad de crecimiento, de metástasis e incluso de sobrevivir al efecto de la quimioterapia, pero nunca se había evaluado el estado del NC de ADNmt y su impacto en la supervivencia y progresión del MM (65,82,83,188).

Respecto a la variación en el NC de ADNmt en la progresión de MMq a MMnd, los resultados de nuevo mostraron que en 9 de los 11 pacientes estudiados se producía un aumento en el NC (Figura 34). Este hecho sugiere una vez más que el contenido mitocondrial debe jugar un papel importante en la transformación de las CP-MM, proporcionando alguna ventaja adicional en el crecimiento, expansión y proliferación del tumor. Interesantemente, además se determinó que este incremento era mayor cuanto mayor era el tiempo en el que se producía la progresión del estadio asintomático al sintomático (Figura 35). Considerando que un MMq que progresa en menos de un año se considera un MMq de alto riesgo (21,22), el hecho de que los pacientes que progresan en menos de 10 meses presenten menor variación en el NC de ADNmt indicaría que las

CP-MM de MMq de alto riesgo son más parecidas en términos de contenido mitocondrial a las del MM sintomático (Figura 35). Debido a la gran discusión que actualmente existe acerca de las ventajas e inconvenientes de tratar a pacientes con MMq, cada vez son más las evidencias que promueven el tratamiento de estos pacientes aludiendo a que biológicamente estas células no difieren mucho de las CP-MM sintomático (21–23). Un tratamiento precoz podría retrasar la aparición de la sintomatología clínica y proporcionar remisiones más duraderas, mejorando así el pronóstico de los pacientes. Por tanto, aunque el número de casos estudiados en este trabajo sea relativamente bajo, el hecho de que la CP de un MMq de alto riesgo presente un contenido mitocondrial similar al de una CP-MM sintomática respaldaría la idea de que el límite establecido entre estado precanceroso y canceroso en MM necesita ser reevaluado. En 2003 el International Myeloma Working Group (IMWG) revisó los criterios diagnósticos para los estadios sintomáticos y asintomáticos del MM, basándose fundamentalmente en factores biológicos y clínicos para establecer los límites (33). En la actualidad existe un único estudio llevado a cabo por el Grupo Español de Mieloma en el que se reportó que el tratamiento de pacientes con MMq de alto riesgo con Lenalidomida + Dexametasona prolongaba significativamente el tiempo de progresión a MM sintomático (23,24). En los últimos años el principal objetivo de los estudios pronóstico ha sido el de encontrar biomarcadores que permitieran la identificación de pacientes con alto riesgo de progresión a MM sintomático que pudieran beneficiarse de un tratamiento precoz, así como nuevos marcadores que permitieran identificar pacientes con pronóstico desfavorable.

Adicionalmente, el análisis de expresión diferencial realizado a partir de datos de expresión de array de muestras correspondientes a distintos estadios del MM confirmó

que existe una sobre expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial, siendo principalmente significativa en el caso de *TFAM*, *MYC* y *TUFM* (Tabla 15). Además, la sobre expresión fue mayor en las muestras correspondientes a estadios sintomáticos de la enfermedad que en los asintomáticos como la GMSI o el MMq (Tabla 15). Un estudio paralelo a la realización de este trabajo y publicado en noviembre de 2017 por Zhan et al mostró resultados similares, reportando la sobreexpresión de los genes que regulan la biogénesis mitocondrial en muestras cerca de 400 muestras de MM y demostrando que los pacientes con mayores valores de expresión presentaban un pronóstico más desfavorable (189). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el NC de ADNmt juega un papel importante en el avance de la enfermedad y en el pronóstico de los pacientes y, además, que existe una coordinación entre la cantidad de ADN y ARN que permiten el uso de esta variable como parámetro subrogatorio de los niveles de expresión génica. Por otro lado, la secuenciación dirigida de los genes responsables de la replicación mitocondrial permitió la detección de 3 mutaciones en 3 de los pacientes cuyas muestras habían sido previamente analizadas por RT-PCR para estimar el ND de ADNmt. Se detectaron dos mutaciones en el gen *POLG* y una en el gen *POLG2* (Tabla 16). *POLG* es la única polimerasa conocida que sintetiza y repara el ADNmt y que se ubica dentro de este orgánulo, aunque está codificada por genes nucleares (190) . Es un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica (*POLG*) y dos subunidades accesorias idénticas (*POLG2*). Mutaciones en estos genes han sido frecuentemente encontradas en pacientes con enfermedades mitocondriales o relacionadas con la edad, y además, siempre se han relacionado con síndrome provocado por depleción mitocondrial (191–195). De las 3 mutaciones detectadas, solo una se encontró en el dominio catalítico de la encima, la S933G, con una frecuencia alélica del 50% y además

predicha como altamente patogénica por SIFT y Polyphen-2 (Tabla 16 y Figura 37). Esta mutación se encontró en las CP-MM de un paciente con MMq que interesantemente presentaba un NC de ADNmt de 57.1, muy inferior a la media y mediana de los valores de NC obtenidos para otros pacientes en el mismo estadio (n=20, 359 y 121 copias respectivamente). Hasta la fecha, más de 150 mutaciones han sido descritas en estos genes, la mayoría causantes de síndromes de depleción mitocondrial, oftalmoplegia externa progresiva o encefalopatía neurogastrointestinal entre otros (196–198). Sin embargo, el número de publicaciones donde se relacionan mutaciones en estos genes con procesos oncológicos es bajo. Solo un estudio realizado en 2009 por Singh et al reportó que el 63% de las pacientes con cáncer de mama presentaban mutaciones en *POLG* (86). La detección de mutaciones en genes implicados la replicación del ADNmt en pacientes con MM muestra una nueva vulnerabilidad de las CP-MM que podría ser empleada como una potencial diana terapéutica para el desarrollo de nuevos tratamientos.

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo y del papel tan crítico que parece tener la mitocondria en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, mayores esfuerzos deben ser realizados para comprender su impacto en la biología de las CP-MM y utilizar esta información en la búsqueda de nuevos biomarcadores de progresión y de predicción pronóstica, así como de nuevas pautas y esquemas de tratamiento.

5.2 ESTRATEGIA BASADA EN TESTS FARMACOLÓGICOS

5.2.1 Modelos farmacodinámicos

Generalmente las muestras de MO de pacientes con MM que se reciben de los hospitales presentan un número bajo de células patológicas vivas. El estudio del impacto

que un bajo número de células tiene en el modelado farmacológico del Bortezomib mostró mínimas diferencias en los parámetros críticos que determinan la sensibilidad o resistencia a un fármaco en un experimento farmacodinámico, que son EC50 y Emax. Si esta situación influyera severamente en el resultado farmacológico del ensayo, numerosas muestras serían rechazadas y, por tanto, la aplicabilidad del test se vería muy comprometida.

Respecto a la selección del tiempo de incubación óptimo para llevar a cabo el ensayo de evaluación de la actividad ex vivo del Bortezomib, se encontró que La *Emax* y su variabilidad inter-paciente poblacional aumentaba en los modelos libres con respecto a los modelos de Emax fija a todos los tiempos de incubación, mientras que la EC50 y su variabilidad Inter-paciente disminuía. Esto parece indicar que las muestras de los pacientes tienden a comportarse de una manera más parecida a tiempos más largos. Por un lado, podría suponer una mayor eficacia antitumoral del Bortezomib a tiempos más largos, algo normal en farmacodinámica, pero también parece señalar que los factores biológicos y genéticos responsables de las distintas respuestas al efecto del fármaco en la clínica estar siendo enmascarados por una sensibilización de las células plasmáticas debido al estrés de la incubación ex vivo y, por tanto, se estaría perdiendo capacidad de estratificación y predicción. A 48h la variabilidad entre pacientes en términos de EC50 fue tan baja y cercana al valor del error aditivo del modelo, no permitiendo la discriminación de EC50 entre pacientes con exactitud. No se podría determinar si las diferencias observadas son debidas a la propia variabilidad inter-paciente o al error del propio modelo farmacológico. Además, se encontraron valores de función objetiva menor y de error aditivo mayor conforme aumentó el tiempo de incubación, lo que indica un peor ajuste de los datos a tiempos más largos (Figura 41).

La correlación entre los valores predichos por los modelos y los observados experimentalmente empeoró al aumentar el tiempo de incubación, indicando una vez más que el tiempo de incubación impacta negativamente en la exactitud del modelo (Figura 42). El estudio de los pacientes con respuesta clínica sensible y resistente al Bortezomib respectivamente, señaló una posible sensibilización ex vivo a tiempos de incubación largos que podría no corresponderse con la realidad clínica (Figura 43).

Estudios previos revelaron que las células con un mayor estrés del proteosoma mostraban una mayor sensibilización al efecto citotóxico del Bortezomib (199). Esto podría deberse a que el mecanismo de acción del Bortezomib consiste en la inhibición de la actividad del proteosoma mediante la unión reversible a su subunidad 26S. Las CP-MM se caracterizan por producir y secretar grandes cantidades de proteína M, con una consiguiente sobreexpresión de la maquinaria de producción, y a la vez de degradación, de proteínas en esas células. Por tanto, a mayor sobrecarga de proteínas poliubiquitinadas mayor será el impacto de su inhibición y más rápidamente se producirá el colapso celular y el inicio de la apoptosis. Sin embargo, todos los fármacos muestran mayor actividad a mayores tiempos de incubación, por lo que para poder discriminar entre sensibilización ex vivo o efectos del tiempo de exposición al fármaco habría que realizar experimentos adicionales. Atendiendo tanto a la naturaleza del mecanismo de acción del Bortezomib como a los errores residuales y la bondad del ajuste de cada modelo a cada tiempo, se podría concluir que el tiempo de incubación que proporciona los mejores resultados y un mayor poder de estratificación es 12h, y el modelo que mejor explica los datos para este tiempo es el modelo libre de 4 parámetros.

Los modelos poblacionales construidos para el Bortezomib, Carfilzomib, Melfalán, bensamustina y Ciclofosfamida mostraron muy buenos valores de bondad de

ajuste, es decir, los modelos describen muy bien los resultados experimentales tanto el modelo libre como el de Emax fija. Gracias a la aplicación de modelado poblacional se pudo cuantificar la variabilidad inter-paciente y diferenciarlo de la variabilidad residual procedente de fenómenos aleatorios de origen experimental (146,147). En los modelos de Emax fija, la variabilidad inter paciente de este parámetro se concentra en el EC50 que mostró una estratificación adecuada.

En el Bortezomib, la variabilidad inter-paciente del modelo libre fue mucho mayor que la del modelo de Emax fija y esto se debe a que la variabilidad perdida en la Emax es absorbida por el parámetro EC50, por lo que aumenta con respecto al modelo libre. Para el otro fármaco del mismo mecanismo de acción inhibidor del proteosoma, el Carfilzomib, no se observó diferencias significativas a 12h entre los dos modelos. Su eficacia y potencia ex vivo fueron ligeramente más altas que el Bortezomib, con unos valores de variabilidad inter paciente en términos de eficacia (Emax) menores y en términos de potencia (EC50) mayores.

Los agentes metilantes fueron ensayados todos a 48h principalmente por dos motivos: el primero porque a este tiempo los ensayos preliminares mostraron valores óptimos de Emax, EC50 y variabilidad inter paciente que permitían conseguir un modelo preciso y con capacidad de estratificación. El segundo porque el objetivo de construir los perfiles farmacológico ex vivo es proporcionar una herramienta adicional al clínico para que pueda pautar el tratamiento más conveniente a cada paciente lo antes posible, por lo que debe escogerse el tiempo de incubación más temprano que estratifique adecuadamente la actividad del fármaco en las muestras de pacientes. Los 3 agentes metilantes mostraron un comportamiento ex vivo muy similar, con valores de eficacia muy altos en todos los casos. Sin embargo, el Melfalán fue el más potente de los tres,

seguido de la Ciclofosfamida y Bendamustina, un orden de potencias que se corresponde con su conocida actividad clínica en pacientes. Sin embargo, la variabilidad entre pacientes de la EC50 mostró un orden contrario, siendo menor en el caso de la Bendamustina, seguido de la Ciclofosfamida y Melfalán. Estos resultados revelan que gracias a la aplicación del modelado poblacional se puede afirmar que mayor potencia poblacional no implica mayor homogeneidad en la respuesta ex vivo.

El comportamiento ex vivo de los corticoides ensayados mostró una limitada capacidad citotóxica y un lento mecanismo de acción, al no detectarse actividad hasta tiempos comprendidos entre las 72 y 96h y solo en el 30% de las muestras ensayadas (Figura 49). Largos tiempos de incubación podrían implicar una disminución en la viabilidad de la muestra al reducirse sustancialmente el número de células patológicas vivas. Aun así, el estudio del comportamiento ex vivo a 96h y aplicando un modelo libre de restricciones mostró que la Dexametasona fue más potente que la Prednisona, mostrando valores inferiores de EC50 (0.0286 vs 67.6 μ M respectivamente) (Figura 49). En el modelo de Emax fija el parámetro EC50 poblacional obtenido estuvo por encima de la dosis máxima ensayada, por lo que la estimación de los parámetros poblacionales se realizó por extrapolación de los datos experimentales careciendo de significado. Estos hallazgos concuerdan con los resultados reportados por ensayos clínicos donde se evaluó la eficacia de la Dexametasona frente a la Prednisona, encontrándose mejores ratios de respuesta en terapias basadas en Dexametasona, aunque también una mayor toxicidad no hematológica, tanto en pacientes en recaída como de nuevo diagnóstico (200,201). Por tanto, el desarrollo de este test podría permitir la detección de pacientes con alta sensibilidad a la Dexametasona, los cuales sí podrían beneficiarse de su mayor actividad anti-mieloma frente a la Prednisona, y al mismo tiempo evitar su

administración a pacientes más resistentes que sufrirían los efectos adversos de este fármaco innecesariamente. Sin embargo, con los datos disponibles no se tiene la suficiente información para concluir si la ausencia de actividad farmacológica en el 70% de los pacientes se debe a una cuestión cinética o a una resistencia real a la actividad del fármaco.

Por otro lado, los ensayos preliminares ex vivo llevados a cabo para determinar el efecto de la combinación de estos dos fármacos con el Bortezomib mostró un aumento en la actividad anti-mieloma del Bortezomib en presencia de estas drogas, principalmente a tiempos de incubación de 48h (Figura 50). De nuevo, estos datos concuerdan con los resultados reportados en ensayos clínicos donde la combinación Bortezomib + Dexametasona o Prednisona mostró mejoras en los ratios de respuesta tanto en pacientes de nuevo diagnóstico como en refractarios (95,97–99). A pesar de que ya se dispone de evidencias clínicas sobre la eficacia de las combinaciones del Bortezomib con la Dexametasona y Prednisona, no existen estudios farmacológicos que permitan estudiar esta potenciación en muestras de pacientes, y medir en cuales de ellos podría ser más beneficiosa la combinación de un fármaco respecto al otro. Estos resultados han servido para rediseñar el procedimiento experimental y actualmente, las muestras recogidas están siendo ensayadas a 8 dosis crecientes de Bortezomib y 2 concentraciones constantes de Dexametasona o Prednisona (10 y 100 μ M), de manera que ahora será posible estudiar la potenciación de la Dexametasona y la Prednisona sobre la actividad del Bortezomib empelando un número muy superior de puntos y dosis.

Los resultados obtenidos de los ensayos farmacológicos con los agentes inmunomoduladores Talidomida, Lenalidomida Y Pomalidomida mostraron que su

mecanismo de acción requiere de tiempos de incubación por encima de las 72h y que su caracterización farmacológica en un ensayo de depleción con muestras primarias de pacientes únicamente se consigue con éxito en un 30% de los pacientes, probablemente los más susceptibles a su efecto citotóxico. Estos resultados promovieron el desarrollo de un nuevo ensayo que consiguiera mejorar las condiciones de viabilidad en cultivos a tiempos largos y que, además, permitiera estudiar el efecto anti proliferativo de estas drogas en muestras de pacientes. Bajo estas nuevas condiciones experimentales y aplicando el mismo modelo farmacodinámico, pero de manera individual y no poblacional, se observó un claro comportamiento diferencial de la actividad de la Lenalidomida y Pomalidomida sobre la población de CP-MM proliferativas con respecto a la población de CP-MM no proliferativas (Figura 51 y Figura 52). Además, se encontró que la inhibición de la proliferación ocurrió a dosis más bajas y con una eficacia mayor que la muerte celular, pudiendo tratarse de dos mecanismos de acción independientes, aunque estrechamente relacionados. Estudios previos en líneas celulares de MM, cuya capacidad de proliferación es mayor que la de muestras primarias de pacientes en cultivo, mostraron una clara actividad anti-proliferativa de estos fármacos, demostrando que la capacidad anti-proliferativa de la Pomalidomida era superior a la de la Lenalidomida (117). En este trabajo pudo caracterizarse por primera vez esta actividad en muestras primarias de pacientes, aunque la comparación directa de la potencia y eficacia de ambas drogas no pudo ser directamente evaluada al no tener datos farmacológicos de ambos compuestos sobre la misma muestra ni un modelo poblacional disponible. Sin embargo, los parámetros farmacodinámicos globales apuntan que también ex vivo se observa una mayor eficacia antiproliferativa de la Pomalidomida respecto a la Lenalidomida (0.006 vs 0.038 [EC50 (μ M)]; 21.5 vs 59.5

[Emax (% Supervivencia)]. La identificación de pacientes con distintas sensibilidades a estos dos efectos abre la posibilidad de emplear este ensayo para la construcción de un test de medicina personalizada que identifique pacientes sensibles y resistentes. El ensayo de un número mayor de muestras permitirá acumular datos suficientes para la construcción de su perfil farmacológico poblacional y caracterizar su actividad anti-proliferativa. Dado que se dispondrá de los datos clínicos de todas las muestras de pacientes ensayadas se podrá realizar la correlación de la respuesta ex vivo con la respuesta clínica y, de esta manera, evaluar la capacidad predictiva del ensayo para finalmente ser incluido en el test de medicina personalizada de MM. Además, la optimización del ensayo de proliferación en muestras de MM proporciona una herramienta de screening farmacológico muy útil para la investigación y desarrollo de nuevas moléculas con semejante mecanismo de acción en fases preclínicas, candidatas a ser empleadas en el tratamiento del MM como, por ejemplo, los IMiDs de cuarta generación.

El estudio de asociación de la actividad ex vivo al Bortezomib y la respuesta clínica de los pacientes, como era de esperar, no mostró resultados estadísticamente significativos. Debido al limitado número de muestras y la gran heterogeneidad en el tratamiento de los pacientes con MM, la correlación de la actividad ex vivo de Bortezomib evaluada en monoterapia no se hizo con pacientes tratados con este fármaco en exclusiva, sino con la respuesta de los pacientes a tratamientos que incluían 1, 2 y hasta 3 fármacos adicionales. El efecto de estos fármacos adicionales no se pudo tener en cuenta al no disponer de los datos farmacológicos conjuntos en las mismas muestras de pacientes, dificultando la correlación clínica. Aunque si se encontró que los pacientes con una sensibilidad alta a la actividad del Bortezomib ex vivo también

presentaron criterios de respuesta clínica positiva (RP, MBRP o RC) en 11 de los 13 pacientes sensibles a la actividad ex vivo del Bortezomib. Dado que las drogas principalmente empleadas en el tratamiento del MM son inhibidores del proteosoma y agentes inmunomoduladores, si pudiera esperarse que la respuesta clínica recayera potencialmente en la sensibilidad del paciente a estos dos tipos de fármacos. A pesar de esto, al ser tratados con más de un fármaco la correlación clínica debe hacerse en cohorte de pacientes homogéneos y, en los casos en los que el paciente haya sido tratado simultáneamente con estos dos tipos de fármacos, se dispongan de datos farmacológicos de ambos para que la sensibilidad a uno de ellos no pueda enmascarar su resistencia al otro. No obstante, el objetivo de esta tesis no era el de realizar una correlación clínica entre la actividad farmacológica y la respuesta clínica de los pacientes, si no el de seleccionar las condiciones experimentales y analíticas óptimas que permitan estudiar la actividad farmacológica de las drogas más comúnmente empleadas en el MM para que, una vez establecidas, sí se diseñe un ensayo observacional que permita la evaluación de su capacidad predictiva.

6.- CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- La aplicación de la secuenciación profunda dirigida permite obtener información acerca del perfil mutacional de los pacientes con una pequeña fracción de muestra y a un coste asumible. No presenta una gran complejidad ni técnica ni analítica, convirtiéndola en una excelente opción para ser implementada en laboratorios de diagnóstico molecular.

2.- La secuenciación dirigida permite obtener valores de cobertura muy superiores a los alcanzados por otras metodologías, como la secuenciación de exoma o genoma completo, permitiendo la detección fiable de mutaciones a bajas frecuencias alélicas con implicaciones pronósticas.

3.- La identificación de grupos de pacientes con pronóstico desfavorable que no habían sido identificados por sus parámetros bioquímico, clínicos o genéticos demuestra su añadido valor diagnóstico y pronóstico a los test convencionales.

4.-La acumulación de mutaciones en los 77 genes estudiados se asocia con un pronóstico desfavorable, tanto en términos de supervivencia libre de progresión como supervivencia global, incluso cuando tales mutaciones se manifiestan a muy bajas frecuencias alélicas.

5- Mutaciones subclonales en el gen *TP53* impactan negativamente en el tiempo de progresión y supervivencia global, a pesar de que los pacientes incluidos en este ensayo clínico recibieron tratamientos de alta eficacia como el Bortezomib o la Lenalidomida. Además, al no ocurrir de manera conjunta con deleciones del brazo 17p, proporciona información pronóstica adicional.

6.- La presencia de mutaciones en alguno de los genes relacionados con la ruta de señalización Cereblon parecen conferir resistencia a la acción farmacológica de la Lenalidomida, pudiéndose emplear como biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento.

7.- El aumento del número de copias de ADNmt detectado en las CP-MM con el avance de la enfermedad parece indicar que la mitocondria juega un papel importante en la transformación maligna de estas células.

8.- Las CP-MM de pacientes con MM quiescente de alto riesgo parecen ser más similares en términos de contenido mitocondrial a las CP-MM sintomático, revelando una nueva evidencia que apoya la teoría de administrar tratamiento temprano a estos pacientes.

9.- Los pacientes de MM de nuevo diagnóstico con mayor número de copias de ADNmt muestran tiempos de recaídas más cortos que el resto, indicando que el contenido mitocondrial podría emplearse como factor pronóstico. Para ello se necesitaría la validación funcional de estos hallazgos.

10.- La determinación del contenido mitocondrial a partir de datos de secuenciación masiva proporciona una nueva aplicación de esta tecnología, que se sumaría al estudio de mutaciones y número de copias comúnmente realizado.

11.- La calidad de los modelos farmacodinámicos obtenidos mediante la aplicación de modelado poblacional confirman que se ha logrado establecer las condiciones óptimas para la evaluación la actividad farmacológica ex vivo de las drogas comúnmente empleadas en el tratamiento del MM.

12.- La potenciación encontrada en la actividad ex vivo del Bortezomib por Dexametasona y Prednisona confirma que el ensayo reproduce fielmente lo observado in vivo en la clínica. La creación de un test de sensibilidad a la combinación permitirá

una mejor aproximación a la realidad clínica, y una mejor predicción de la respuesta del paciente.

13.- El desarrollo de un test ex vivo que mide la actividad anti proliferativa de los agentes inmunomoduladores en muestras de pacientes con éxito permitirá evaluar más fielmente su sensibilidad. Además, proporciona un modelo ex vivo de MM para el screening de nuevos fármacos con actividad anti proliferativa en fases clínicas o preclínicas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Borrello I. Can we change the disease biology of multiple myeloma? *Leuk Res.* 2012 Nov;36:S3–12.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2004 Oct 28;351(18):1860–73.
3. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016 Jan;91(1):101–19.
4. Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *The Lancet.* 2004 Mar;363(9412):875–87.
5. Bladé J, Kyle RA, Greipp PR. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol.* 1996 May;93(2):345–51.
6. Chen J-H, Chung C-H, Wang Y-C, Hsu S-N, Huang W-Y, Chien W-C. Prevalence and Mortality-Related Factors of Multiple Myeloma in Taiwan. Wu P-H, editor. *PLOS ONE.* 2016 Dec 1;11(12):e0167227.
7. Smith D, Yong K. Advances in understanding prognosis in myeloma. *Br J Haematol.* 2016 Nov;175(3):367–80.
8. Chretien M-L, Hebraud B, Cances-Lauwers V, Hulin C, Marit G, Leleu X, et al. Age is a prognostic factor even among patients with multiple myeloma younger than 66 years treated with high-dose melphalan: the IFM experience on 2316 patients. *Haematologica.* 2014 Jul 1;99(7):1236–8.
9. Yusuf AA, Natwick T, Werther W, Felici D, Mahue M, Bridges KR, et al. A retrospective analysis to examine factors associated with mortality in Medicare

beneficiaries newly diagnosed with multiple myeloma. *Curr Med Res Opin.* 2016 Dec;32(12):1989–96.

10. Schull WJ. Late radiation responses in man: current evaluation from results from Hiroshima and Nagasaki. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR.* 1983;3(8):231–9.

11. Becker N. Epidemiology of multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer.* 2011;183:25–35.

12. Pottern LM, Gart JJ, Nam JM, Dunston G, Wilson J, Greenberg R, et al. HLA and multiple myeloma among black and white men: evidence of a genetic association. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 1992 Apr;1(3):177–82.

13. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood.* 1998 Jan 1;91(1):3–21.

14. Hsu HC, Lee YM, Yang CF, Hsiao KJ, Liu TT, Ho CK, et al. Detection of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in bone marrow biopsy samples from patients with multiple myeloma. *Cancer.* 2001 Apr 15;91(8):1409–13.

15. Sjak-Shie NN, Vescio RA, Berenson JR. The role of human herpesvirus-8 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999 Dec;13(6):1159–67.

16. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009 May 28;113(22):5412–7.

17. Dhodapkar MV. MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood.* 2016 08;128(23):2599–606.

18. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1546–58.
19. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer.* 2012 Apr 12;12(5):335–48.
20. Rajkumar SV. MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2005;340–5.
21. Rosiñol L, Bladé J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Montoto S, et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol.* 2003 Nov;123(4):631–6.
22. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007 Jun 21;356(25):2582–90.
23. Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide plus Dexamethasone for High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2013 Aug;369(5):438–47.
24. Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide plus dexamethasone versus observation in patients with high-risk smouldering multiple myeloma (QuiRedex): long-term follow-up of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Aug;17(8):1127–36.
25. Majithia N, Rajkumar SV, Lacy MQ, Buadi FK, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. Early relapse following initial therapy for multiple myeloma predicts poor outcomes in the era of novel agents. *Leukemia.* 2016 Nov;30(11):2208–13.

26. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017 Jan 1;3(1):28.
27. LeBlanc T, Howson A, Turell W, Sheldon P, Locke SC, Tuchman SA, et al. Risk stratification, treatment selection, and transplant eligibility in multiple myeloma: a qualitative study of the perspectives and self-reported practices of oncologists. *Curr Oncol*. 2016 Dec 22;23(6):598.
28. Zatula A, Dikic A, Mulder C, Sharma A, Vågbø CB, Sousa MML, et al. Proteome alterations associated with transformation of multiple myeloma to secondary plasma cell leukemia. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Mar 21 [cited 2018 Jan 23];8(12). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/14294>
29. Kyle RA. Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cells Dayt Ohio*. 1995 Aug;13 Suppl 2:56–63.
30. Rajkumar SV, Greipp PR. Prognostic factors in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999 Dec;13(6):1295–314, xi.
31. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975 Sep;36(3):842–54.
32. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412–20.
33. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(5):749–57.

34. Lee CK, Ma ESK, Shek TWH, Lam CCK, Au WY, Wan TSK, et al. Plasmablastic transformation of multiple myeloma. *Hum Pathol*. 2003 Jul;34(7):710–4.
35. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales M-B, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutiérrez N, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2737–44.
36. Bataille R, Jégou G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau J-L, Moreau P, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006 Sep;91(9):1234–40.
37. Hermansen NEU, Borup R, Andersen MK, Vangsted AJ, Clausen NT, Kristensen DL, et al. Gene expression risk signatures maintain prognostic power in multiple myeloma despite microarray probe set translation. *Int J Lab Hematol*. 2016 Jun;38(3):298–307.
38. van Laar R, Flinchum R, Brown N, Ramsey J, Riccitelli S, Heuck C, et al. Translating a gene expression signature for multiple myeloma prognosis into a robust high-throughput assay for clinical use. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 Mar 17];7(1). Available from: <http://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8794-7-25>
39. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3037–42.

40. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, Kaiser MF, Begum DB, Dahir NB, et al. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood*. 2013 Apr 25;121(17):3413–9.
41. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001 Sep;20(40):5611–22.
42. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, et al. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood*. 1995 Dec 1;86(11):4250–6.
43. Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, McCoy J, Tricot G, Jacobson J, et al. Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence *in situ* hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *Br J Haematol*. 2003 Jan;120(1):44–52.
44. An G, Xu Y, Shi L, Shizhen Z, Deng S, Xie Z, et al. Chromosome 1q21 gains confer inferior outcomes in multiple myeloma treated with Bortezomib but copy number variation and percentage of plasma cells involved have no additional prognostic value. *Haematologica*. 2014 Feb;99(2):353–9.
45. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim C-S, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014 Feb;28(2):269–77.
46. Jian Y, Chen X, Zhou H, Zhu W, Liu N, Geng C, et al. Prognostic Impact of Cytogenetic Abnormalities in Multiple Myeloma: A Retrospective Analysis of 229 Patients. *Medicine (Baltimore)*. 2016 May;95(19):e3521.

47. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23–8.
48. Jelinek DF, Ahmann GJ, Greipp PR, Jalal SM, Westendorf JJ, Katzmann JA, et al. Coexistence of aneuploid subclones within a myeloma cell line that exhibits clonal immunoglobulin gene rearrangement: clinical implications. *Cancer Res*. 1993 Nov 1;53(21):5320–7.
49. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011 Oct;11(10):726–34.
50. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013 Sep 19;501(7467):346–54.
51. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013 Sep;501(7467):338–45.
52. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):175–87.
53. Egan JB, Shi C-X, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012 Aug 2;120(5):1060–6.
54. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011 Mar;471(7339):467–72.
55. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.

56. Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 1999 Feb;1410(2):103–23.
57. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci.* 2000 Feb;7(1):2–15.
58. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;26(6):711–23.
59. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029–33.
60. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012 Oct;12(10):685–98.
61. Zong W-X, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell.* 2016 Mar;61(5):667–76.
62. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res.* 2001 May;488(2):119–33.
63. Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D. Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2011 May;4(5):638–54.
64. Verschoor ML, Ungard R, Harbottle A, Jakupciak JP, Parr RL, Singh G. Mitochondria and cancer: past, present, and future. *BioMed Res Int.* 2013;2013:612369.
65. Tan AS, Baty JW, Dong L-F, Bezawork-Geleta A, Endaya B, Goodwin J, et al. Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metab.* 2015 Jan;21(1):81–94.
66. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat J-P, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):751–62.

67. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Oct;15(10):634–46.
68. Suzuki S, Naito A, Asano T, Evans TT, Reddy SAG, Higuchi M. Constitutive activation of AKT pathway inhibits TNF-induced apoptosis in mitochondrial DNA-deficient human myelogenous leukemia ML-1a. *Cancer Lett.* 2008 Sep;268(1):31–7.
69. Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, et al. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res.* 2005 Mar 1;65(5):1655–63.
70. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 18;102(3):719–24.
71. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science.* 2008 May 2;320(5876):661–4.
72. Yuan Y, Wang W, Li H, Yu Y, Tao J, Huang S, et al. Nonsense and missense mutation of mitochondrial ND6 gene promotes cell migration and invasion in human lung adenocarcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Mar 19];15(1). Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1349-z>
73. Yang Y, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Curr Med Chem.* 2013;20(30):3677–92.

74. Imanishi H, Hattori K, Wada R, Ishikawa K, Fukuda S, Takenaga K, et al. Mitochondrial DNA Mutations Regulate Metastasis of Human Breast Cancer Cells. Aziz SA, editor. PLoS ONE. 2011 Aug 11;6(8):e23401.
75. Veltri KL, Espiritu M, Singh G. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. J Cell Physiol. 1990 Apr;143(1):160–4.
76. mtdnacn in muscle and heart.pdf.
77. Tobe SS, Linacre AMT. A technique for the quantification of human and non-human mammalian mitochondrial DNA copy number in forensic and other mixtures. Forensic Sci Int Genet. 2008 Sep;2(4):249–56.
78. Wu C-W, Yin P-H, Hung W-Y, Li AF-Y, Li S-H, Chi C-W, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2005 Sep;44(1):19–28.
79. Kim MM, Clinger JD, Masayesva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH, et al. Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8512–5.
80. Lin P-C, Lin J-K, Yang S-H, Wang H-S, Li AF-Y, Chang S-C. Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. Int J Colorectal Dis. 2008 Dec;23(12):1223–32.
81. Reznik E, Miller ML, Şenbabaoğlu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. eLife [Internet]. 2016 Feb 22 [cited 2018 Feb 17];5. Available from: <https://elifesciences.org/articles/10769>

82. Egan K, Kusao I, Troelstrup D, Agsalda M, Shiramizu B. Mitochondrial DNA in residual leukemia cells in cerebrospinal fluid in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Med Res*. 2010 Oct 11;2(5):225–9.
83. Kusao I, Agsalda M, Troelstrup D, Villanueva N, Shiramizu B. Chemotoxicity recovery of mitochondria in non-Hodgkin lymphoma resulting in minimal residual disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Aug;51(2):193–7.
84. Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci*. 2011 Jul 18;89(3–4):65–71.
85. Chang S-C, Lin P-C, Yang S-H, Wang H-S, Liang W-Y, Lin J-K. Mitochondrial D-loop mutation is a common event in colorectal cancers with p53 mutations. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Jun;24(6):623–8.
86. Singh KK, Ayyasamy V, Owens KM, Koul MS, Vujcic M. Mutations in mitochondrial DNA polymerase-gamma promote breast tumorigenesis. *J Hum Genet*. 2009 Sep;54(9):516–24.
87. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2516–20.
88. Moreau P. The future of therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: emerging agents and novel treatment strategies. *Semin Hematol*. 2012 Jul;49 Suppl 1:S33-46.
89. Barlogie B, Smith L, Alexanian R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med*. 1984 May 24;310(21):1353–6.
90. VMP_jesus San NEng.pdf.

91. Spanswick VJ, Lowe HL, Newton C, Bingham JP, Bagnobianchi A, Kiakos K, et al. Evidence for different mechanisms of 'unhooking' for melphalan and cisplatin-induced DNA interstrand cross-links in vitro and in clinical acquired resistant tumour samples. *BMC Cancer* [Internet]. 2012 Dec [cited 2018 Feb 17];12(1). Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-436>
92. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet Lond Engl*. 2007 Dec 1;370(9602):1861–74.
93. Berkovich R. Treatment of acute relapses in multiple sclerosis. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2013 Jan;10(1):97–105.
94. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, Dispenzieri A, Geyer SM, Kabat B, et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4050–3.
95. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2005 Jun 16;352(24):2487–98.
96. Sharma S, Lichtenstein A. Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1338–45.
97. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, et al. Bortezomib Plus Dexamethasone Induction Improves Outcome of Patients With t(4;14) Myeloma but Not Outcome of Patients With del(17p). *J Clin Oncol*. 2010 Oct 20;28(30):4630–4.

98. Jagannath S, Durie BGM, Wolf J, Camacho E, Irwin D, Lutzky J, et al. Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005 Jun;129(6):776–83.
99. Kropff MH, Bisping G, Wenning D, Volpert S, Tchinda J, Berdel WE, et al. Bortezomib in combination with dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *Leuk Res*. 2005 May;29(5):587–90.
100. Orlowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, Bladé J, Hajek R, Spencer A, et al. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus Bortezomib compared with Bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Sep 1;25(25):3892–901.
101. Accardi F, Toscani D, Bolzoni M, Dalla Palma B, Aversa F, Giuliani N. Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *BioMed Res Int*. 2015;2015:172458.
102. bor_mechanism_action.pdf.
103. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3281–90.
104. Murray MY, Auger MJ, Bowles KM. Overcoming Bortezomib resistance in multiple myeloma. *Biochem Soc Trans*. 2014 Aug;42(4):804–8.
105. Lü S, Wang J. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor Bortezomib. *Biomark Res*. 2013 Mar 1;1(1):13.

106. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999 Nov 18;341(21):1565–71.
107. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):2943–50.
108. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4525–30.
109. Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):210–6.
110. Chang X, Zhu Y, Shi C, Stewart AK. Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2014 Mar 1;46(3):240–53.
111. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immunomodulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013 Apr;54(4):683–7.
112. Hideshima T, Chauhan D, Podar K, Schlossman RL, Richardson P, Anderson KC. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Semin Oncol*. 2001 Dec;28(6):607–12.
113. Verhelle D, Corral LG, Wong K, Mueller JH, Moutouh-de Parseval L, Jensen-Pergakes K, et al. Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells. *Cancer Res*. 2007 Jan 15;67(2):746–55.

114. González Rodríguez AP. Management of the adverse effects of lenalidomide in multiple myeloma. *Adv Ther.* 2011 Mar;28 Suppl 1:1–10.
115. Leleu X, Rodon P, Hulin C, Daley L, Dauriac C, Hacini M, et al. MELISSE, a large multicentric observational study to determine risk factors of venous thromboembolism in patients with multiple myeloma treated with immunomodulatory drugs. *Thromb Haemost.* 2013 Oct;110(4):844–51.
116. Kortüm KM, Zhu YX, Shi CX, Jedlowski P, Stewart AK. Cereblon binding molecules in multiple myeloma. *Blood Rev.* 2015 Sep;29(5):329–34.
117. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood.* 2011 Nov 3;118(18):4771–9.
118. Konstantinidou MK, Karaglanı M, Panagopoulou M, Fiska A, Chatzaki E. Are the Origins of Precision Medicine Found in the Corpus Hippocraticum? *Mol Diagn Ther.* 2017 Dec;21(6):601–6.
119. König IR, Fuchs O, Hansen G, von Mutius E, Kopp MV. What is precision medicine? *Eur Respir J.* 2017 Oct;50(4).
120. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177–82.
121. O’Sullivan CC, Bradbury I, Campbell C, Spielmann M, Perez EA, Joensuu H, et al. Efficacy of Adjuvant Trastuzumab for Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Early Breast Cancer and Tumors ≤ 2 cm: A Meta-Analysis of the Randomized Trastuzumab Trials. *J Clin Oncol.* 2015 Aug 20;33(24):2600–8.

122. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Feb;11(2):121–8.
123. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002 Jan 10;346(2):92–8.
124. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):947–57.
125. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012 Mar;13(3):239–46.
126. Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, Eggermont AM, Schilsky RL, Mendelsohn J, et al. Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Nov 10;33(32):3817–25.
127. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Nov 20;33(33):3911–20.
128. Kortuem KM, Braggio E, Bruins L, Barrio S, Shi CS, Zhu YX, et al. Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2016 Feb;6(2):e397–e397.

129. Rashid NU, Sperling AS, Bolli N, Wedge DC, Van Loo P, Tai Y-T, et al. Differential and limited expression of mutant alleles in multiple myeloma. *Blood*. 2014 Nov 13;124(20):3110–7.
130. Majumder B, Baraneedharan U, Thiyagarajan S, Radhakrishnan P, Narasimhan H, Dhandapani M, et al. Predicting clinical response to anticancer drugs using an ex vivo platform that captures tumour heterogeneity. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Feb 26];6(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms7169>
131. Silva A, Silva MC, Sudalagunta P, Distler A, Jacobson T, Collins A, et al. AnEx VivoPlatform for the Prediction of Clinical Response in Multiple Myeloma. *Cancer Res*. 2017 Jun 15;77(12):3336–51.
132. Hernández P, Gorrochategui J, Primo D, Robles A, Rojas JL, Espinosa AB, et al. Drug Discovery Testing Compounds in Patient Samples by Automated Flow Cytometry. *SLAS Technol*. 2017 Jun;22(3):325–37.
133. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. *J Intern Med*. 2000 May;247(5):521–34.
134. Garraway LA, Jänne PA. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov*. 2012 Mar;2(3):214–26.
135. Abdi J, Chen G, Chang H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget* [Internet]. 2013 Dec 26 [cited 2018 Feb 26];4(12). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/1497>
136. Piatkowska M, Styczynski J, Kolodziej B, Kurylo-Rafinska B, Kubicka M, Pogorzala M, et al. Individualized tumor response testing profile has a prognostic value in childhood acute leukemias: multicenter non-interventional long-term follow-up study. *Leuk Lymphoma*. 2013 Jun;54(6):1256–62.

137. Swords RT, Azzam D, Al-Ali H, Lohse I, Volmar C-H, Watts JM, et al. Ex-vivo sensitivity profiling to guide clinical decision making in acute myeloid leukemia: A pilot study. *Leuk Res*. 2018 Jan;64:34–41.
138. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer*. 2009 Sep;9(9):665–74.
139. Holt RU, Baykov V, Rø TB, Brabrand S, Waage A, Sundan A, et al. Human myeloma cells adhere to fibronectin in response to hepatocyte growth factor. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):479–88.
140. Kuhn DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, Ma W, et al. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome Bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2012 Oct 18;120(16):3260–70.
141. Shain KH, Dalton WS. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther*. 2001 Nov;1(1):69–78.
142. Di Marzo L, Desantis V, Solimando AG, Ruggieri S, Annese T, Nico B, et al. Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Sep 13 [cited 2018 Feb 26];7(37). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10849>
143. Pottier C, Wheatherspoon A, Roncarati P, Longuespée R, Herfs M, Duray A, et al. The importance of the tumor microenvironment in the therapeutic management of cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15(8):943–54.
144. Bennett TA, Montesinos P, Moscardo F, Martinez-Cuadron D, Martinez J, Sierra J, et al. Pharmacological profiles of acute myeloid leukemia treatments in patient

samples by automated flow cytometry: a bridge to individualized medicine. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2014 Aug;14(4):305–18.

145. Mitsuhashi M, Endo K, Obara K, Izutsu H, Ishida T, Chikatsu N, et al. Ex vivo simulation of the action of antileukemia drugs by measuring apoptosis-related mRNA in blood. Clin Chem. 2008 Apr;54(4):673–81.

146. Pérez-Urizar J, Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling: why? Arch Med Res. 2000 Dec;31(6):539–45.

147. Mould DR, Upton RN. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development-part 2: introduction to pharmacokinetic modeling methods. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol. 2013 Apr 17;2:e38.

148. Dartois C, Brendel K, Comets E, Laffont CM, Laveille C, Tranchand B, et al. Overview of model-building strategies in population PK/PD analyses: 2002–2004 literature survey. Br J Clin Pharmacol. 2007 Nov;64(5):603–12.

149. Verotta D. Covariate Modeling in Population PK/PD Models: an Open Problem. Adv Pharmacoepidemiol Drug Saf [Internet]. 2012 [cited 2018 Apr 3];01(S1). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/covariate-modeling-in-population-pk-pd-models-an-open-problem-2167-1052.S1-006.php?aid=10087>

150. Goutelle S, Maurin M, Rougier F, Barbaut X, Bourguignon L, Ducher M, et al. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. Fundam Clin Pharmacol. 2008 Dec;22(6):633–48.

151. Schoemaker RC, van Gerven JM, Cohen AF. Estimating potency for the Emax-model without attaining maximal effects. J Pharmacokinet Biopharm. 1998 Oct;26(5):581–93.

152. Nyberg J, Bazzoli C, Ogungbenro K, Aliev A, Leonov S, Duffull S, et al. Methods and software tools for design evaluation in population pharmacokinetics-pharmacodynamics studies: Software for designs in pharmacometrics. *Br J Clin Pharmacol*. 2015 Jan;79(1):6–17.
153. Keizer RJ, Karlsson MO, Hooker A. Modeling and Simulation Workbench for NONMEM: Tutorial on Pirana, PsN, and Xpose. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol*. 2013 Jun 26;2:e50.
154. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1980 Dec;8(6):553–71.
155. Stone JA, Banfield C, Pfister M, Tannenbaum S, Allerheiligen S, Wetherington JD, et al. Model-based drug development survey finds pharmacometrics impacting decision making in the pharmaceutical industry. *J Clin Pharmacol*. 2010 Sep;50(9 Suppl):20S–30S.
156. Zandvliet AS, Schellens JHM, Beijnen JH, Huitema ADR. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics for treatment optimization in clinical oncology. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(8):487–513.
157. Mateos M-V, Martinez-Lopez J, Hernandez M-T, Ocio E-M, Rosinol L, Martinez R, et al. Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood*. 2016 Jan 28;127(4):420–5.
158. Liang H, Zou G. Improved AIC Selection Strategy for Survival Analysis. *Comput Stat Data Anal*. 2008 Jan 20;52(5):2538–48.
159. Wachsmuth M, Hübner A, Li M, Madea B, Stoneking M. Age-Related and Heteroplasmy-Related Variation in Human mtDNA Copy Number. *PLoS Genet*. 2016 Mar;12(3):e1005939.

160. Chu H-T, Hsiao WWL, Tsao TTH, Chang C-M, Liu Y-W, Fan C-C, et al. Quantitative assessment of mitochondrial DNA copies from whole genome sequencing. *BMC Genomics*. 2012;13 Suppl 7:S5.
161. Ding J, Sidore C, Butler TJ, Wing MK, Qian Y, Meirelles O, et al. Assessing Mitochondrial DNA Variation and Copy Number in Lymphocytes of ~2,000 Sardinians Using Tailored Sequencing Analysis Tools. *PLoS Genet*. 2015 Jul;11(7):e1005306.
162. Qian Y, Butler TJ, Opsahl-Ong K, Giroux NS, Sidore C, Nagaraja R, et al. fastMitoCalc: an ultra-fast program to estimate mitochondrial DNA copy number from whole-genome sequences. *Bioinformatics*. 2017 May 1;33(9):1399–401.
163. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
164. Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W. Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes. Malik HS, editor. *PLoS Genet*. 2010 Feb 12;6(2):e1000834.
165. Samur MK, Yan Z, Wang X, Cao Q, Munshi NC, Li C, et al. canEvolve: a web portal for integrative oncogenomics. *PloS One*. 2013;8(2):e56228.
166. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*. 2004 May 1;13(9):935–44.
167. Picca A, Lezza AMS. Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM-mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies. *Mitochondrion*. 2015 Nov;25:67–75.
168. Dominy JE, Puigserver P. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jul 1;5(7).

169. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 15;79(2):208–17.
170. Morrish F, Hockenbery D. *MYC* and Mitochondrial Biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 May 1;4(5):a014225–a014225.
171. Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, et al. *MYC* Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul 15;25(14):6225–34.
172. Jeong SH, Kim HK, Song I-S, Noh SJ, Marquez J, Ko KS, et al. Echinochrome a increases mitochondrial mass and function by modulating mitochondrial biogenesis regulatory genes. *Mar Drugs*. 2014 Aug 21;12(8):4602–15.
173. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010;47:69–84.
174. Dzwonek A, Mikula M, Ostrowski J. The diverse involvement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in mitochondrial response to insulin. *FEBS Lett*. 2006 Mar 20;580(7):1839–45.
175. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.
176. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread Genetic Heterogeneity in Multiple Myeloma: Implications for Targeted Therapy. *Cancer Cell*. 2014 Jan;25(1):91–101.
177. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*. 2014 Aug;28(8):1705–15.

178. Lionetti M, Barbieri M, Todoerti K, Agnelli L, Fabris S, Tonon G, et al. A compendium of *DIS3* mutations and associated transcriptional signatures in plasma cell dyscrasias. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Sep 22 [cited 2018 Feb 8];6(28). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/4674>
179. Weißbach S, Langer C, Puppe B, Nedeva T, Bach E, Kull M, et al. The molecular spectrum and clinical impact of *DIS3* mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2015 Apr;169(1):57–70.
180. Chang H, Trieu Y, Qi X, Xu W, Stewart KA, Reece D. Bortezomib therapy response is independent of cytogenetic abnormalities in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leuk Res*. 2007 Jun;31(6):779–82.
181. Pineda-Roman M, Zangari M, Haessler J, Anaissie E, Tricot G, van Rhee F, et al. Sustained complete remissions in multiple myeloma linked to Bortezomib in total therapy 3: comparison with total therapy 2. *Br J Haematol*. 2008 Mar;140(6):625–34.
182. Lode L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wuilleme S, Richebourg S, et al. Mutations in *TP53* are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010 Nov 1;95(11):1973–6.
183. Chin M, Sive JJ, Allen C, Roddie C, Chavda SJ, Smith D, et al. Prevalence and timing of *TP53* mutations in del(17p) myeloma and effect on survival. *Blood Cancer J*. 2017 Sep 15;7(9):e610.
184. Kortum KM, Mai EK, Hanafiah NH, Shi C-X, Zhu Y-X, Bruins L, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in *CRBN* and Ras pathway genes. *Blood*. 2016 Sep 1;128(9):1226–33.

185. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, Kortuem KM, Bruins LA, Schmidt JE, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):536–45.
186. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*. 2011 Nov 3;118(18):4771–9.
187. Kortüm KM, Mai EK, Hanafiah NH, Shi C-X, Zhu Y-X, Bruins L, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in *CRBN* and Ras pathway genes. *Blood*. 2016 01;128(9):1226–33.
188. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*. 2008 May 2;320(5876):661–4.
189. Zhan X, Yu W, Franqui-Machin R, Bates ML, Nadiminti K, Cao H, et al. Alteration of mitochondrial biogenesis promotes disease progression in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017 Dec 19;8(67):111213–24.
190. Hudson G, Chinnery PF. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R244-252.
191. Copeland WC. The Mitochondrial DNA Polymerase in Health and Disease. In: Nasheuer H-P, editor. *Genome Stability and Human Diseases* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010 [cited 2018 Apr 17]. p. 211–22. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-90-481-3471-7_11
192. Tang S, Wang J, Lee N-C, Milone M, Halberg MC, Schmitt ES, et al. Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *J Med Genet*. 2011 Oct;48(10):669–81.

193. Da Pozzo P, Cardaioli E, Rubegni A, Gallus GN, Malandrini A, Rufa A, et al. Novel POLG mutations and variable clinical phenotypes in 13 Italian patients. *Neurol Sci.* 2017 Apr;38(4):563–70.
194. Varma H, Faust PL, Iglesias AD, Lagana SM, Wou K, Hirano M, et al. Whole exome sequencing identifies a homozygous POLG2 missense variant in an infant with fulminant hepatic failure and mitochondrial DNA depletion. *Eur J Med Genet.* 2016 Oct;59(10):540–5.
195. Young MJ, Longley MJ, Li F-Y, Kasiviswanathan R, Wong L-J, Copeland WC. Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Hum Mol Genet.* 2011 Aug 1;20(15):3052–66.
196. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med.* 2008;59:131–46.
197. Walter MC, Czermin B, Muller-Ziermann S, Bulst S, Stewart JD, Hudson G, et al. Late-onset ptosis and myopathy in a patient with a heterozygous insertion in POLG2. *J Neurol.* 2010 Sep;257(9):1517–23.
198. Wong L-JC, Naviaux RK, Brunetti-Pierri N, Zhang Q, Schmitt ES, Truong C, et al. Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Hum Mutat.* 2008 Sep;29(9):E150-172.
199. Bianchi G, Oliva L, Cascio P, Pengo N, Fontana F, Cerruti F, et al. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood.* 2009 Mar 26;113(13):3040–9.
200. Hernández JM, García-Sanz R, Golvano E, Bladé J, Fernandez-Calvo J, Trujillo J, et al. Randomized comparison of dexamethasone combined with melphalan versus

melphalan with prednisone in the treatment of elderly patients with multiple myeloma.

Br J Haematol. 2004 Oct;127(2):159–64.

201. Facon T, Mary J-Y, Pégourie B, Attal M, Renaud M, Sadoun A, et al.

Dexamethasone-based regimens versus melphalan-prednisone for elderly multiple myeloma patients ineligible for high-dose therapy. Blood. 2006 Feb 15;107(4):1292–8.

8.- ANEXO

8. ANEXO

➤ Anexo 1: Publicaciones

Artículo 1:

Mutational screening of newly diagnosed multiple myeloma patients by deep targeted sequencing. **Ruiz-Heredia Y**, Sánchez-Vega B, Onecha E, Barrio S et al. Haematologica. 2018 Jun 28. pii: haematol.2018.188839

Artículo 2:

Concurrent progressive multifocal leukoencephalopathy and central nervous system infiltration by multiple myeloma: A case report. **Ruiz-Heredia Y**, Sanchez-Vega B, Barrio S, Linares M et al. J Oncol Pharm Pract. 2018 Jan 1:1078155218769367.

Artículo 3:

Novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. Onecha E, Linares M, Rapado I, **Ruiz-Heredia Y** et al. Haematologica. 2018 Aug 9. pii: haematol.2018.194712.

Artículo 4:

Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma. J Martinez-Lopez, B Sanchez-Vega, S Barrio, I Cuenca, **Y Ruiz-Heredia** et al. Leukemia volume31, pages1446–1449 (2017).

Artículo 5:

Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. Paiva B, Puig N, Cedena MT, de Jong BG, **Ruiz Y** et al. Leukemia. 2017 Feb;31(2):382-392.

➤ Anexo 2: Tabla suplementaria 1

Mutaciones detectadas en los 79 pacientes estudiado por secuenciación profunda dirigida.

➤ **Anexo 3: Tabla suplementaria 2**

Dosis ensayadas de cada fármaco testado en monoterapia, expresadas en μM .

Mutational screening of newly diagnosed multiple myeloma patients by deep targeted sequencing

Multiple myeloma (MM) is a hematologic neoplasm that develops after transformation and excessive growth of plasma cells in the bone marrow. MM is characterized by heterogeneous genetic abnormalities and an extensive range of clinical outcomes.^{1,2} The marked variability of responses and the limited clinical prognostic value of the current genetic information justify the need to identify new biomarkers of response and develop personalized medicine strategies.³ The recent introduction of next-generation sequencing technologies has considerably advanced our understanding of the biological features of MM.⁴⁻⁶ Accordingly, we used a targeted deep sequencing panel, applying the highest read depth to date, to detect

minor subclones and evaluated their impact on response to treatment. We also integrated these data with the clinical features of a very homogeneous cohort of patients to unearth new patterns of genetic alterations and gain new insights into the complexity of the clonal and subclonal architecture of MM.

We analyzed 79 tumor samples from newly diagnosed MM patients enrolled in the GEM10MAS65 clinical trial (registered at www.clinicaltrials.gov as #NCT01237249).⁷ This phase II study enrolled patients older than 65 years, and randomly assigned them to one of two treatment arms: sequential melphalan/prednisone/bortezomib (MPV) followed by lenalidomide/low-dose dexamethasone (Rd), or alternating MPV with Rd. This clinical trial was carried out in compliance with the Helsinki Declaration: it was approved by the appropriate research

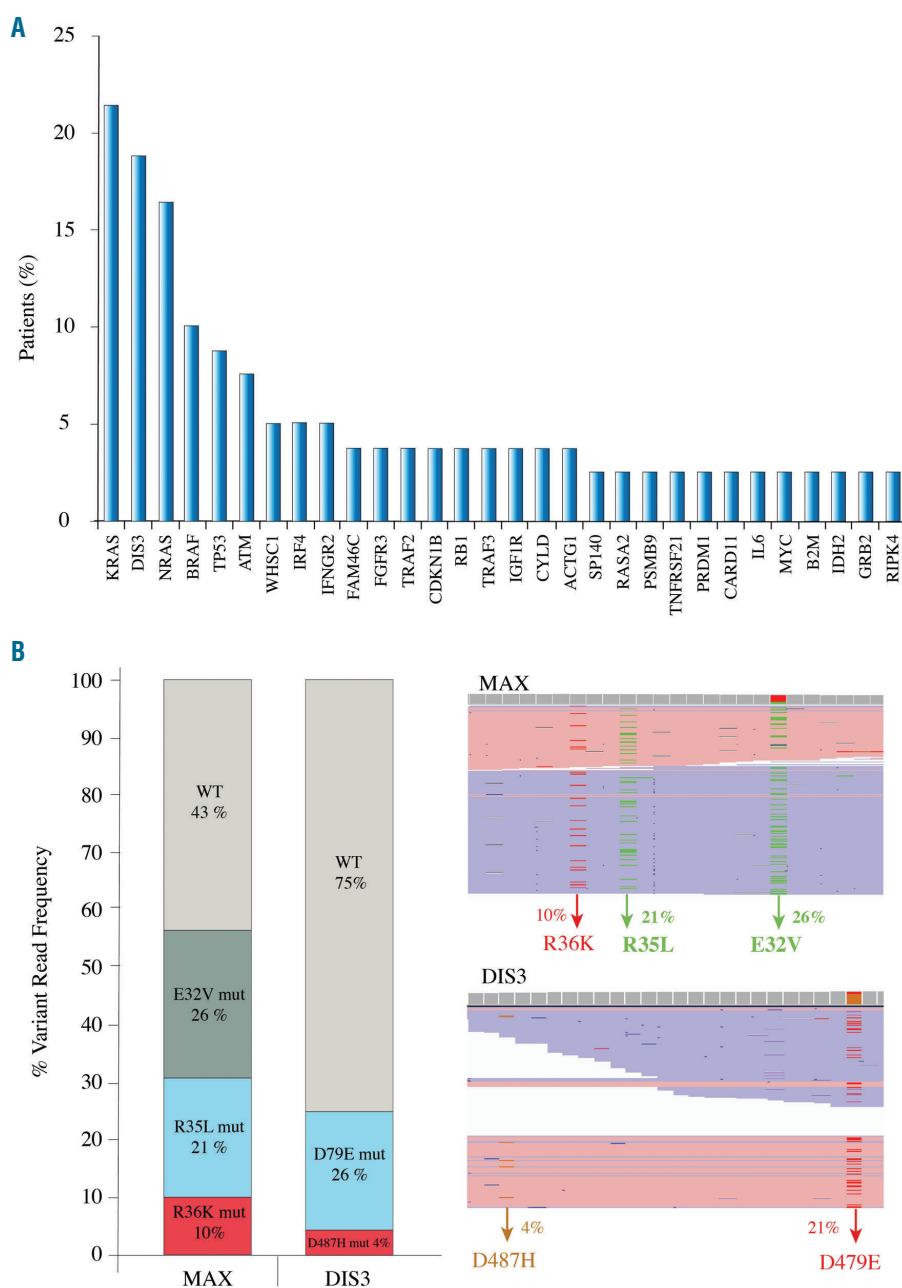


Figure 1. Mutated genes and parallel clonal evolution. (A) Fifty-four genes were mutated in 79 newly diagnosed MM patients. *KRAS*, *DIS3*, *NRAS*, *BRAF* and *TP53* mutations accounted for 42% of all the mutations. (B) MAX (right and up) and *DIS3* (left and down) showed concomitant mutations within the same patient. The proximity between subclonal mutations enabled us to detect that variants were in different sequencing reads, indicating a possible parallel subclonal evolution.

Ethics Committees and all participants provided written informed consent before inclusion. The median time to progression of this cohort of patients was 26.4 months and the median follow up was 31.5 months. Plasma cells were enriched from bone marrow aspirates using anti-CD138⁺ immunomagnetic beads obtaining a purity higher than 85% in all cases and only 20 ng of DNA were used for library construction. The panel screens 77 genes that are frequently mutated in MM, including those related to critical pathophysiological pathways, genes associated with drug resistance, or those targetable by molecular drugs (*Online Supplementary Table S1*).⁸⁻¹⁰ The average coverage depth for CD138⁺ and CD138⁻ samples was 1600 × and 900 ×, respectively. The minimum coverage of the detected variants was 20 ×, and the average cover-

age was 370 ×. We applied two different bioinformatics pipelines developed by ThermoFisher (Ion reporter 5.0) and by the Spanish National Cancer Research Center (*Rubioseq*, <http://rubioseq.bioinfo.cnio.es/>).¹¹ We also sequenced 11 germline fractions available to confirm that most of the germinal variants had been correctly excluded by our conservative filter criteria.

We identified 168 non-synonymous missense/non-sense/stop-loss single variants, of which 81 (48%) were predicted to be pathogenic by SIFT and PolyPhen-2, and 61 (36%) have been described in the COSMIC database. Eighty-five percent of patients harbored at least one mutation, with there being a median of 2.1 mutations per patient. Mutations were detected in 53 genes, although the following five genes accounted for 42% of the total

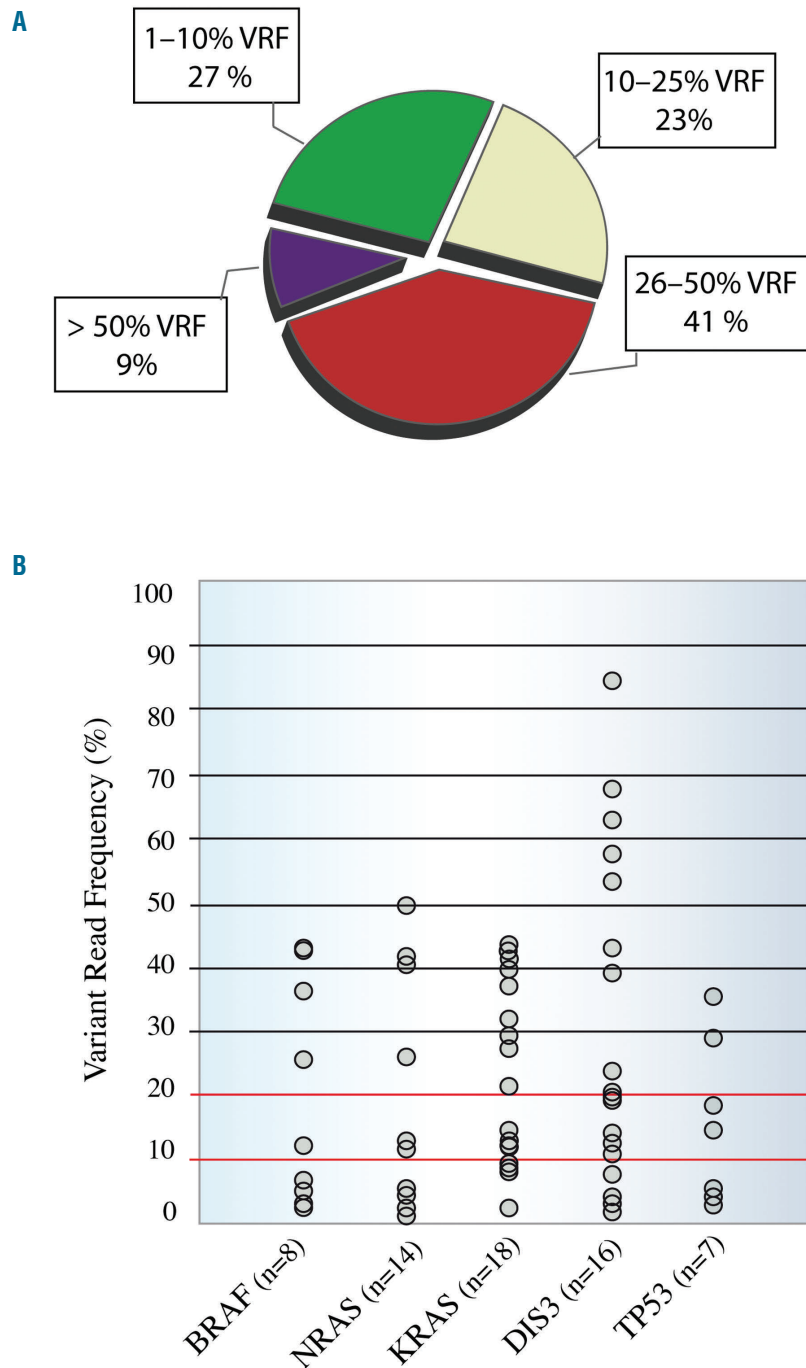


Figure 2. Clonal and subclonal heterogeneity and variant read frequency distributions. (A) Fifty percent of mutations (85/168) had a variable read frequency (VRF) <25%, and almost half of them (46/168) had a VRF <10%. These values highlight the importance of detecting variants at very low frequencies in newly diagnosed patients. (B) Distribution of the detected variants in the most frequently mutated genes. The number of patients harboring the mutations is indicated below the name of the gene. *DIS3* was the only gene in which a mutation VRF >50% was found.

number of mutations: *KRAS* (21.5% of patients), *DIS3* (19%), *NRAS* (16.5%), *BRAF* (10.1%) and *TP53* (8.8%) (Figure 1A). The *RAS* pathway was the most recurrently mutated, present in 48% (39/79) of patients. Seventy-two and 100% of *KRAS* and *NRAS* mutations, respectively, were detected at the hotspot codons 12, 13 and 61, and the targetable *BRAF* V600E activating mutation was detected in one patient. *KRAS* and *BRAF* mutations were co-existent in three patients, while *RAS* was always mutated exclusively. NF- κ B was the second most fre-

quently mutated pathway in our cohort, accounting for 15% of all mutations; mutations were found in the genes of 25% of the patients (19/79), including the adapter signaling genes *TRAF3* (1 nonsense and 4 missense) and *TRAF2* (3 missense). All were predicted to be pathogenic by SIFT and PolyPhen-2. Other pathways that were altered in our cohort were *MYC*, in 11% of patients (9/79), and Cereblon and Cyclin, each found in 9% of patients (7/79). Multiple mutations in the same gene were observed in 12 patients, affecting *DIS3* (n=4), *KRAS*

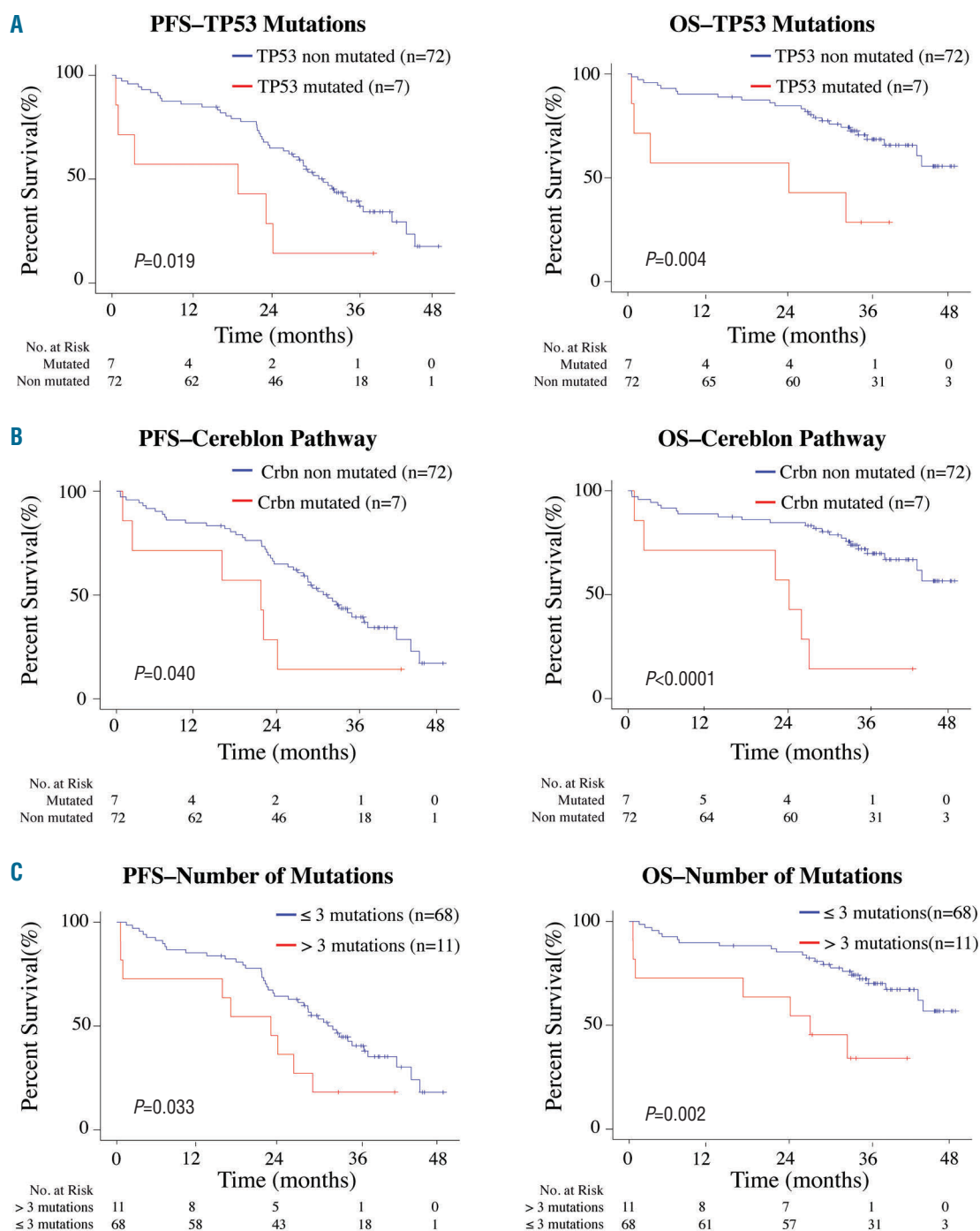


Figure 3. Negative impact of genetic alterations on progression-free survival (left) and overall survival (right). (A) Mutations in *TP53*. (B) Mutations in the Cereblon pathway. (C) More than three mutations (1 mutation/61 kb of DNA).

($n=3$), *NRAS* ($n=2$), *MAX* ($n=1$), *TRAF3* ($n=1$) and *TP53* ($n=1$) genes. The *MAX* mutations were missense and were located at the known *MAX* hotspots E32V, R35L and R36K. All three *MAX* mutations were found to be subclonal, with variant read frequencies (VRF) of 26%, 21% and 10%, respectively. Interestingly, due to the proximity between mutations it was possible to confirm that each variant was located on a different sequencing read, with no read containing more than one mutation (Figure 1B). Since this patient had a diploid karyotype, the entire tumor was affected by the mutations in the *MAX* gene, but with a parallel evolution of the three different subclones. The same finding was made in one of the patients who harbored multiple mutations in *DIS3* (Figure 1B); in this case, the two D487H and D479E hotspot mutations were subclonal, with a VRF of 4% and 21%, respectively, and presented exclusively in different reads. Our cohort of patients revealed a broad VRF landscape, with 50% of variants (85/170) having a VRF below 25% and 27% (46/170) having a VRF below 10% (Figure 2A). The VRF of most of the mutations in *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* and *TP53* was lower than 40%, while that of *DIS3* mutations showed a broader range (2% to 85%) (Figure 2B). The *DIS3* gene had the largest number of low VRF mutations (5/20), all of which were considered to be pathogenic by SIFT and PolyPhen-2, and four of which were located in hotspots of the catalytic RNB domain (Online Supplementary Figure S1D).

We also evaluated the impact on survival of each individual mutated gene, and of genes grouped according to their pathways. No significant impact on survival was observed for *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* or *DIS3* genes or for the RAS and NF- κ B pathways. The existence of multiple mutations in the same gene or the number of subclonal mutations (<40% VRF) did not affect patients' survival. However, *TP53* mutations were associated with a negative impact on progression-free survival and overall survival ($P=0.019$ and $P=0.004$, respectively) (Figure 3A). Patients with mutations in the Cereblon pathway had significantly shorter progression-free survival and overall survival ($P=0.040$ and $P<0.0001$, respectively) (Figure 3B). We also noted a negative impact on progression-free survival and overall survival as a function of the number of mutations: patients with more than three mutations (>1 mutation per 61 kb of DNA analyzed) relapsed and died prematurely ($P=0.033$ and $P=0.002$, respectively) (Figure 3C). We performed multivariate survival analysis using a Cox regression model with the Akaike Information Criterion technique for the selection of demographic and cytogenetic variables. The variables selected to build the model were International Staging System score, Eastern Cooperative Oncology Group score and the patient's age. We found a significant negative impact on survival for *TP53* mutations (progression-free survival: hazard ratio, 3.68; 95% confidence interval: 1.45–9.29, $P=0.005$; overall survival: hazard ratio, 9.07; 95% confidence interval: 2.78–9.57, $P=0.0002$).

The genes and pathways found to be most frequently mutated in this study are consistent with those in previous reports (*KRAS* 21% versus 21%, *NRAS* 18% versus 16%, *BRAF* 7% versus 8% and *TP53* 8% versus 8%).^{6,9} The exception was *DIS3*, for which the mutational incidence increased from 9% to 19% due to the deep coverage which enabled the detection of a higher number of subclonal mutations (5/20). In addition, the VRF of mutated RAS genes (<50% in all cases) supports the hypothesis that newly diagnosed MM patients who are not exposed to selective pressure by a therapy are more likely to harbor subclonal than clonal RAS mutations.⁵ The detection

of minor subclones has allowed the identification of a subgroup of patients with poor outcome who would not have been identified by their cytogenetic profile or clinical manifestation, including those negative for del(17p) but positive for *TP53* mutations.¹² Considering the detection threshold in whole-genome and whole-exome sequencing studies, very useful genetic information might be being overlooked. Additionally, the recent discovery that Cereblon is essential for the anti-MM activity of immunomodulatory drugs^{13–15} is especially relevant here because patients enrolled in the GEM10MAS65 trial were all treated with lenalidomide, suggesting that downstream genes such as *IKZF1*, *IKZF2*, *IRF4* and *MYC* should be additionally studied when biomarkers of lenalidomide resistance need to be identified.

In conclusion, this is the first prospective study addressing the role of targeted sequencing in a highly homogeneous series of elderly, newly diagnosed MM patients treated within a clinical trial. Despite the limited number of samples included in the study, the next-generation sequencing strategy used here was capable of detecting mutations in purified plasma cells in most patients. The affordability of next-generation sequencing together with the small sample requirement offers an excellent opportunity to introduce personalized medicine protocols into clinical practice and also to intensify the search for new biomarkers and therapeutic targets to improve treatment selection and survival of MM patients.

Yanira Ruiz-Heredia,¹ Beatriz Sánchez-Vega,¹ Esther Onecha,¹ Santiago Barrio,² Rafael Alonso,³ Jose Carlos Martínez-Ávila,⁴ Isabel Cuenca,¹ Xabier Agirre,⁵ Esteban Braggio,⁶ Miguel-T. Hernández,⁷ Rafael Martínez,⁸ Laura Rosiñol,⁹ Norma Gutiérrez,¹⁰ Marisa Martín-Ramos,⁹ Enrique M. Ocio,¹⁰ María-Asunción Echeveste,¹¹ Jaime Pérez de Oteyza,¹² Albert Oriol,¹⁰ Joan Bargay,¹³ Mercedes Gironella,¹⁴ Rosa Ayala,¹ Joan Bladé,¹⁵ María-Victoria Mateos,¹⁰ Klaus M. Kortum,³ Keith Stewart,⁶ Ramón García-Sanz,¹⁰ Jesús San Miguel,⁵ Juan José Lahuerta³ and Joaquín Martínez-López¹

¹Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre - Hematological Malignancies Clinical Research Unit H120-CNIO, Madrid, Spain; ²Department of Internal Medicine II, University Hospital Würzburg, Germany; ³Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁴Clinical Pharmacology Department, La Paz University Hospital, IDIPAZ, UAM, Madrid, Spain; ⁵Department of Hematology, Fundación de Investigación Médica Aplicada (FIAMA), Pamplona, Spain; ⁶Department of Hematology, Mayo Clinic, Phoenix/Scottsdale, AZ, USA; ⁷Department of Hematology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ⁸Department of Hematology, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, Spain; ⁹Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain; ¹⁰Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca-Centro Investigación del Cáncer and Hospital Universitario-IBSAL, Salamanca, Spain; ¹¹Department of Hematology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain; ¹²Department of Hematology, Hospital Madrid Norte Sanchinarro, Madrid, Spain; ¹³Department of Hematology, Hospital Sont Llatzer, Palma de Mallorca, Spain; ¹⁴Department of Hematology, Hospital Universitario Vall de Hebrón de Barcelona, Spain and ¹⁵Department of Hematology, Hospital Clínic i Provincial, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Funding: this work was partially supported by a CRIS foundation grant, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) (RD12/0036/0061), Joan Rodés grant (JR 14/00016), Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en

Salud i-PFIS (IFI 14/00008) and Fondo de Investigación Sanitaria PI15/01484 awarded to Joaquín Martínez López


Correspondence: jmarti01@med.ucm.es
doi:10.3324/haematol.2018.188839

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Avet-Loiseau H, Durie BGM, Cavo M, et al. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia*. 2013;27(3):711-717.
2. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia*. 2012;26(2):349-355.
3. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111(5):2516-2520.
4. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.
5. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(1):91-101.
6. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3911-3920.
7. Mateos M-V, Martínez-López J, Hernández M-T, et al. Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood*. 2016;127(4):420-425.
8. Kortüm KM, Langer C, Monge J, et al. Longitudinal analysis of 25 sequential sample-pairs using a custom multiple myeloma mutation sequencing panel (M(3)P). *Ann Hematol*. 2015;94(7):1205-1211.
9. Kortuem KM, Braggio E, Bruins L, et al. Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2016;6(2):e397.
10. Bolli N, Li Y, Sathiseelan V, et al. A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2016;6(9):e467.
11. Rubio-Camarillo M, Gómez-López G, Fernández JM, Valencia A, Pisano DG. RUBioSeq: a suite of parallelized pipelines to automate exome variation and bisulfite-seq analyses. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013;29(13):1687-1689.
12. Kortüm KM, Langer C, Monge J, et al. Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M 3 P) in -17p high risk disease. *Br J Haematol*. 2015;168(4):507-510.sup
13. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014;124(4):536-545.
14. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*. 2011;118(18):4771-4779.
15. Kortum KM, Mai EK, Hanafiah NH, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood*. 2016;128(9):1226-1233.

Concurrent progressive multifocal leucoencephalopathy and central nervous system infiltration by multiple myeloma: A case report

Yanira Ruiz-Heredia¹, Beatriz Sanchez-Vega¹, Santiago Barrio²,
María Linares¹, Inmaculada Rapado¹, Esteban Braggio³,
Keith Stewart³, M Dolores Folgueira⁴, Ana Ramos⁵,
Luis Collado⁶, Juan Ruiz⁷, Oscar Toldos⁸,
Aurelio Hernandez-Lain⁸ and Joaquin Martinez-Lopez¹ 

J Oncol Pharm Practice

0(0) 1–5

© The Author(s) 2018

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1078155218769367

journals.sagepub.com/home/opp



Abstract

Progressive multifocal leucoencephalopathy rarely occurs in patients with multiple myeloma. Intracranial central nervous system invasion is also an uncommon event in multiple myeloma, occurring in less than 1% of cases. We describe herein an exceptional case of coexisting progressive multifocal leucoencephalopathy and intraparenchymal central nervous system myeloma infiltration. A 73-year-old woman with relapsed multiple myeloma was treated with 15 cycles of lenalidomide and dexamethasone, but therapy had to be stopped because of a hip fracture after a fall. During hospitalization, the patient developed progressive multifocal leucoencephalopathy caused by John Cunningham virus, and a prominent intra-parenchymal CD138-positive infiltrate was detected. VDJ rearrangements of the immunoglobulin heavy chain gene and the mutational profile of plasma cells in bone marrow at the time of diagnosis and in brain biopsy after progression were analyzed by next generation sequencing, showing genetic differences between medullary and extramedullary myeloma cells. The role of long-term treatment with lenalidomide and dexamethasone in the development progressive multifocal leucoencephalopathy or intraparenchymal central nervous system myeloma infiltration remains unknown. However, our results suggest that both events may have arisen as a consequence of treatment-related immunosuppression. Thus, an appropriate clinical approach compatible with the simultaneous treatment of progressive multifocal leucoencephalopathy and multiple myeloma should be developed.

Keywords

Progressive multifocal leucoencephalopathy, central nervous system myeloma infiltration, John Cunningham virus, immunomodulator side effect

Date received: 17 January 2018; revised: 11 March 2018; accepted: 14 March 2018

¹Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Hematological Malignancies Clinical Research Unit H120-CNIO, Madrid, Spain

²Department of Internal Medicine II, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany

³Department of Hematology, Mayo Clinic, Phoenix/Scottsdale, USA

⁴Department of Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁵Department of Radiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁶Department of Internal Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

⁷Department of Neurology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁸Department of Pathology (Neuropathology), Hospital Universitario 12 de Octubre – Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

Corresponding author:

Joaquin Martinez-Lopez, Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Hematological Malignancies Clinical Research Unit H120-CNIO, Centro Actividades Ambulatorias, 6 Planta, Bloque D, Avenida de Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain.
Email: jmarti01@med.ucm.es



Ferrata Storti Foundation

A novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia

Esther Onecha,^{1,2} Maria Linares,^{1,2} Inmaculada Rapado,^{1,2,3}
 Yanira Ruiz-Heredia,^{1,2} Pilar Martinez-Sanchez,¹ Teresa Cedena,^{1,2,3,4}
 Marta Pratcorona,⁵ Jaime Perez Oteyza,⁶ Pilar Herrera,⁷ Eva Barragan,^{4,8}
 Pau Montesinos,^{4,8} Jose Antonio Garcia Vela,⁹ Elena Magro,¹⁰
 Eduardo Anguita,¹¹ Angela Figuera,¹² Rosalia Riaz,¹³
 Pilar Martinez-Barranco,¹⁴ Beatriz Sanchez-Vega,^{1,2} Josep Nomdedeu,⁵
 Miguel Gallardo,^{2*} Joaquin Martinez-Lopez^{1,2,3,4*} and Rosa Ayala^{1,2,3,4*}

Haematologica 2019
 Volume 104(2):288-296

¹Hematology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; ²Hematological Malignancies Clinical Research Unit, CNIO, Madrid; ³Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), Madrid; ⁴Complutense University, Madrid; ⁵Hematology Department, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ⁶Hematology Department, Hospital Universitario Sanchinarro, Madrid; ⁷Hematology Department, Hospital Universitario Ramon y Cajal, Madrid; ⁸Hematology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ⁹Department of Hematology, Hospital Universitario de Getafe, Madrid; ¹⁰Hematology Department, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Madrid; ¹¹Hematology Department, Hospital Clínico San Carlos, IdISSC, UCM, Madrid; ¹²Hematology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid; ¹³Hematology Department, Hospital Universitario Severo Ochoa, Madrid and ¹⁴Hematology Department, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid, Spain

*MG, JM-L and RA contributed equally to this work.

ABSTRACT

A high proportion of patients with acute myeloid leukemia who achieve minimal residual disease negative status ultimately relapse because a fraction of pathological clones remains undetected by standard methods. We designed and validated a high-throughput sequencing method for minimal residual disease assessment of cell clonotypes with mutations of *NPM1*, *IDH1/2* and/or *FLT3*-single nucleotide variants. For clinical validation, 106 follow-up samples from 63 patients in complete remission were studied by sequencing, evaluating the level of mutations detected at diagnosis. The predictive value of minimal residual disease status by sequencing, multiparameter flow cytometry, or quantitative polymerase chain reaction analysis was determined by survival analysis. The sequencing method achieved a sensitivity of 10^{-4} for single nucleotide variants and 10^{-5} for insertions/deletions and could be used in acute myeloid leukemia patients who carry any mutation (86% in our diagnostic data set). Sequencing-determined minimal residual disease positive status was associated with lower disease-free survival (hazard ratio 3.4, $P=0.005$) and lower overall survival (hazard ratio 4.2, $P<0.001$). Multivariate analysis showed that minimal residual disease positive status determined by sequencing was an independent factor associated with risk of death (hazard ratio 4.54, $P=0.005$) and the only independent factor conferring risk of relapse (hazard ratio 3.76, $P=0.012$). This sequencing-based method simplifies and standardizes minimal residual disease evaluation, with high applicability in acute myeloid leukemia. It is also an improvement upon flow cytometry- and quantitative polymerase chain reaction-based prediction of outcomes of patients with acute myeloid leukemia and could be incorporated in clinical settings and clinical trials.

Correspondence:

rosam.ayala@salud.madrid.org

Received: April 2, 2018.

Accepted: August 8, 2018.

Pre-published: August 9, 2018.

doi:10.3324/haematol.2018.194712

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/104/2/288

©2019 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>. Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



Introduction

Cytogenetic and molecular alterations at diagnosis and response to treatment are the most useful criteria for predicting the relative risk of relapse in acute myeloid leukemia (AML), and for guiding the choice between chemotherapy and

hematopoietic stem cell transplantation in first complete remission.¹ The definition of complete remission for AML includes criteria for the identification of patients with poor prognosis using cytomorphological methods,² but these studies do not have a good predictive value because most of the patients in complete remission relapse within 3 years of diagnosis.³

Assessment of minimal residual disease (MRD) is critical in monitoring patients in morphological remission, to inform decisions about further therapy.¹ Indeed, several studies have reported MRD status as a stronger predictor of relapse, because patients who are MRD negative have a better prognosis than those who are MRD positive.^{4,5} In support of this, recent non-randomized studies from prospective multicenter trials suggested better outcomes when leukemia therapy was selected based on the results of MRD assessment.⁶⁻⁸

AML is, nevertheless, a biologically complex and heterogeneous disease, which makes MRD testing more challenging in this condition than in other hematologic neoplasms such as acute lymphoblastic leukemia or multiple myeloma. The detection of very low levels of MRD by conventional methods such as quantitative (q) polymerase chain reaction (PCR) or multiparameter flow cytometry (MFC) provides powerful independent prognostic information. Unfortunately, as described for cytomorphological complete remission, many patients who achieve MRD negative status relapse as a result of the progression of undetected leukemic cells. The most common method for MRD detection is MFC, which has intermediate applicability (70–80%) and limited sensitivity.^{9,10} However, there is no consensus on multi-antibody panels with regards to inter-laboratory performance, and the technique requires a high level of expertise. The other principal method for monitoring MRD, qPCR, has good sensitivity (10^{-4} – 10^{-6}), but its applicability is limited to the approximately 40% of patients who present with molecular alterations (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11* or *NPM1*) at diagnosis.¹¹

For the above reasons, new methods with higher sensitivity, specificity, applicability and performance are needed for MRD assessment in AML. Against this background, next-generation sequencing (NGS) and digital PCR (dPCR) have recently emerged as potentially promising platforms for the assessment of MRD.¹² Here, we optimized and clinically validated a new deep targeted NGS-based method, supported with dPCR technical validation, for the detection and quantification of MRD [both small insertion/deletions (indels) and single nucleotide variants (SNV)] in AML patients, in an attempt to improve and/or complement the current techniques for MRD evaluation, and to establish its potential as a predictor of patients' outcome.

Methods

More detailed information can be found in the *Online Supplementary Data (1–6)*.

Patients and samples

One hundred and ninety patients with *de novo* or secondary non-M3 AML were included in mutational profile screening at diagnosis. We performed a new selection for retrospective MRD assessment using the following criteria: presence of the *NPM1* type A mutation, or SNV in *FLT3*, *IDH1* and/or *IDH2* at diagno-

sis, and availability of at least one follow-up genomic (g)-DNA sample.

The MRD approach was applied to 51 (48%) follow-up samples taken after induction therapy and 55 (52%) taken after consolidation, corresponding to 63 patients diagnosed between 2006 and 2016 (for selection criteria see *Online Supplement 6 and Supplementary Table S4*). Patients were treated according to PETHEMA (*Programa Español de Tratamientos en Hematología*) or CETLAM (*Grupo cooperativo de Estudio y Tratamiento de Leucemias Agudas y Mielodisplasias*) protocols. The study was conducted according to Spanish law 14/2007 on biomedical research, and was approved by the Research Ethics Board of each participating institution. All patients provided informed consent. The main clinical characteristics of the patients are summarized in Table 1. All patients achieved complete remission according to cytomorphological criteria after induction therapy (<5% of bone marrow blasts).

To construct calibration curves, commercial (Horizon Discovery, UK) reference standard gDNA was used for somatic SNV in *IDH1* (R132C) and *IDH2* (R172K). As a further source of gDNA, we used the OCI-AML3 cell line (ACC 582, DSMZ, Germany) with the *NPM1* type A mutation (c.863_864insCCTG) to examine indels. As OCI-AML3 cells also present a SNV in *DNMT3A* (R882C), this was included only for technical optimization.

Deep targeted sequencing workflow

The sequencing workflow included a first study at diagnosis and a second study at follow-up. Mutational profile screening at diagnosis was done with a customized NGS myeloid panel of 32 genes frequently mutated in myeloid diseases,¹³ (*Online Supplementary Table S2*) and *NPM1* analysis was carried out with qPCR.¹⁴

The specific mutations detected at diagnosis were studied at follow-up. We first tested a variety of experimental steps to define optimal conditions (*Online Supplement 1*). We established an optimal protocol (Figure 1) that included DNA amplification, library preparation and sequencing as experimental steps (*Online Supplement 2*).

Libraries were sequenced on the Ion Proton System platform (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) with an estimated depth $\geq 1,000,000$ of reads, generating .fastq files. These files were analyzed using a customized bioinformatic pipeline; which leads from the .fastq file and a .csv file that contains information about name identifier, run and barcode identifier, chromosomal position and the variant detected in the diagnosis to be evaluated in the follow-up sample. Through Ensembl Perl API,¹⁵ the aligned mutated sequence and the aligned wild-type (wt) sequence are presented in FASTA format (sequences of 40 bp). Finally, we obtained a .csv file containing the name identifier, run and barcode identifier, chromosomal position, the variant, the specific target sequence in FASTA format (mutated forward, mutated reverse, wt forward and wt reverse), the counts of each and the ratio (mutated/wt) in absolute values.

Results

A high percentage of acute myeloid leukemia patients could benefit from deep sequencing minimal residual disease assessment

In total, 211 (80%) SNV and 46 (20%) indels were detected in the 190 patients analyzed at diagnosis using the customized NGS panel. We detected one variant (SNV or indel) in 48 (25%) cases, two or more variants in 116

(61%) cases and no variants in 26 (14%) cases. In addition, we detected the *NPM1* type A mutation in 53 (28%) patients by qPCR. Genes (*TET2*, *ASXL1*, or *DNMT3A*) with evidence of an association with clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) were excluded from the analysis.¹¹ Consequently, 82% of patients in our cohort could benefit from this approach.

Based on those genes reported as potential markers for monitoring MRD,¹⁶ and also the availability of follow-up samples, we focused on *IDH1/2* and *FLT3*-SNV. We identified at diagnosis *IDH1* mutations in 13 patients (7%), *IDH2* mutations in 27 patients (14%) and *FLT3*-SNV mutations (18%) in 34 patients.

Deep sequencing minimal residual disease assessment has a sensitivity of 10⁻⁴ for single nucleotide variants and 10⁻⁵ for insertions-deletions

To establish the limit of quantification (LOQ) of the method, we used 10-fold serial dilutions of mixed mutated and control DNA. To study prototype indels, we used gDNA from OCI-AML3 cells (*NPM1* type A) and to study prototype SNV, we used both gDNA from OCI-AML3 cells (*DNMT3A*) and commercial reference gDNA (*IDH1/IDH2*). As a control, we used a pool of gDNA from ten individuals without somatic mutations in these chromosomal regions. In all cases, initial allele frequency was 50% and a total of six dilutions were tested to construct a calibration curve, covering a theoretical dynamic range from 10⁻¹ to 10⁻⁷.

As shown in Figure 2A,B, MRD NGS testing of *NPM1* (indel) could quantify one mutated cell in the order of 10⁻⁵ normal ones and in the case of SNV (*IDH1*, *IDH2* and *DNMT3A*) the LOQ was 10⁻⁴, which was reproducible for all SNV tested.

Next-generation sequencing is more sensitive than digital polymerase chain reaction analysis for minimal residual disease assessment

We compared the sensitivity of the sequencing method with that of dPCR using the same LOQ dilution protocol. Clone frequency expressed as target concentration (mutated copies/μL in wt copies/μL) gradually decreased with each dilution, reaching a LOQ of 10⁻³ for *NPM1*, *IDH1* and *IDH2* (Figure 2C,D). While both methods showed similar detection limits and good linearity, the LOQ for the sequencing method was one order of magnitude higher than that for dPCR (*IDH1* and *IDH2*), and two orders of magnitude higher for indels (*NPM1*).

Minimal residual disease status assessed by sequencing has prognosis value in acute myeloid leukemia

The median depth coverage was 401,300 aligned reads (interquartile range 195,100–825,700) for the 88 *NPM1* and 18 SNV (9 *IDH1*, 7 *IDH2*, and 2 *FLT3*) follow-up samples evaluated. We detected no mutated sequence in 13 (12%) samples, one to five mutated sequences in 19 (18%) samples, and more than ten in 74 (70%) samples. The ratio of mutated sequences to wt sequences defined MRD levels. Considering MRD levels from the 106 samples evaluated we established the optimal cutoff to classify MRD status (positive versus negative) by receiver operating characteristic curves (Online Supplementary Figure S1) at each check-point of MRD evaluation [post-induction (n=51), post-consolidation (n=55), or both together (n=106)].

Survival analysis revealed that positive MRD status (MRD levels >0.1%) after induction (n=35) was associated with a significantly lower rate of overall survival [33% versus 78%; hazard ratio (HR): 3.5; 95% confidence interval (CI): 1.1–10.7; *P*=0.019], but a non-significant lower rate of disease-free survival (58% versus 78%; HR: 2.18; 95% CI: 0.63–7.5; *P*=0.208) (Figure 3A,B). In post-consolidation samples (n=28), MRD positive status

Table 1. Main characteristics of the patients with acute myeloid leukemia included in the minimal residual disease study.

Patients (n = 63)	
Follow-up sample type	
Bone marrow	58 (92%)
Peripheral blood	5 (8%)
Sex	
Male	21 (33%)
Female	42 (67%)
Age at diagnosis, median	54 (IQR, 41.5–66.0)
Blasts at diagnosis, median count	69 (IQR, 51.0–81.0)
Leukocytes at diagnosis median count (×10 ⁹ /L)	15.7 (IQR, 12.2–20.24)
Secondary AML	
No	59 (94%)
Yes	4 (6%)
Cytogenetic risk	
Favorable	25 (40%)
Intermediate	36 (57%)
Adverse	2 (3%)
<i>FLT3</i> -ITD	
<i>FLT3</i> negative	49 (78%)
<i>FLT3</i> positive	14 (22%)
<i>FLT3</i> -TKD	
<i>FLT3</i> negative	60 (95%)
<i>FLT3</i> positive	3 (5%)
<i>NPM1</i>	
<i>NPM1</i> negative	6 (10%)
<i>NPM1</i> positive	57 (90%)
Hematopoietic stem cell transplantation	
No	42 (67%)
Allogeneic	7 (11%)
Autologous	14 (22%)
Relapse	
No	42 (67%)
Yes	21 (33%)
Death	
No	40 (63%)
Yes	23 (37%)
Treatment*	
3+7 regimen	50 (80%)
Flugaza	8 (13%)
Mylotarg	2 (3%)
Panobidara	3 (4%)

AML: acute myeloid leukemia; ITD: internal tandem duplications; TKD: tyrosine kinase domain; *3+7 regimen of chemotherapy: one or two induction cycles of cytarabine and idarubicin for 7 and 3 days, respectively; and two or three consolidation cycles of high doses of cytarabine, twice a day for 3 alternate days followed by allogeneic or autologous hematopoietic stem cell transplantation. The remainder of the patients were included in other clinical trials (Mylotarg, NCT0104104; Flugaza, NCT02319135; Panobidara, NCT00840346). Clinical data were collected in the following Spanish AML epidemiological registries: NCT01700413, NCT02006004, NCT00464217, NCT02607059, NCT01041040 and NCT01296178.

(MRD levels >0.025%) was associated with both significantly shorter overall survival (33% versus 81%; HR: 6.0; 95% CI: 1.3–28.7; $P<0.001$) and significantly shorter disease-free survival (17% versus 94%; HR: 19.6; 95% CI: 2.5–155.6; $P<0.001$) (Figure 3C,D). Survival outcomes were also analyzed combining post-induction and post-consolidation ($n=63$) tests, in order to compare survival analysis with MFC and qPCR data sets. We observed that positive MRD status (MRD levels >0.035%) was associated with a higher risk of relapse (48% versus 81%; HR: 3.4; 95% CI: 1.4–8.5; $P=0.005$) and death (37% versus 81%; HR: 4.2; 95% CI: 1.6–10.7; $P<0.001$) (Figure 3E,F). In order to test the power of *NPM1* and SNV as independent predictive markers, we performed the analysis separately. Evaluating *NPM1* as an MRD marker ($n=54$), we found that MRD positive status was associated with both significantly shorter overall survival (43% versus 78%; HR: 3.3; 95% CI: 1.2–8.8; $P=0.011$), and

shorter disease-free survival (57% versus 85%; HR: 2.9; 95% CI: 0.9–7.6; $P=0.052$). Similar results were found when we evaluated *IDH1*, *IDH2* or *FLT3*-SNV as MRD markers ($n=11$). Accordingly, MRD positive status was associated with both significantly shorter overall survival (17% versus 100%; HR: not applicable; $P=0.041$), and shorter disease-free survival (17% versus 75%; HR: 6.3; 95% CI: 0.7–54; $P=0.058$).

In univariate Cox analysis (Table 2A), the risk of death was significantly higher with increasing age (HR: 1.04; $P=0.013$), in patients with *FLT3*-ITD (HR: 3.45; $P=0.007$), and in those with MRD positive status as determined by NGS (HR: 4.22; $P=0.002$). The risk of relapse was significantly higher only in those patients with MRD positive status determined by NGS (HR: 3.4; $P=0.008$). In multivariate analysis (Table 2B), the risk of death was significantly higher with increasing age (HR: 1.05; $P=0.004$), in patients with mutated *FLT3*-ITD (HR: 8.87; $P=0.001$), and

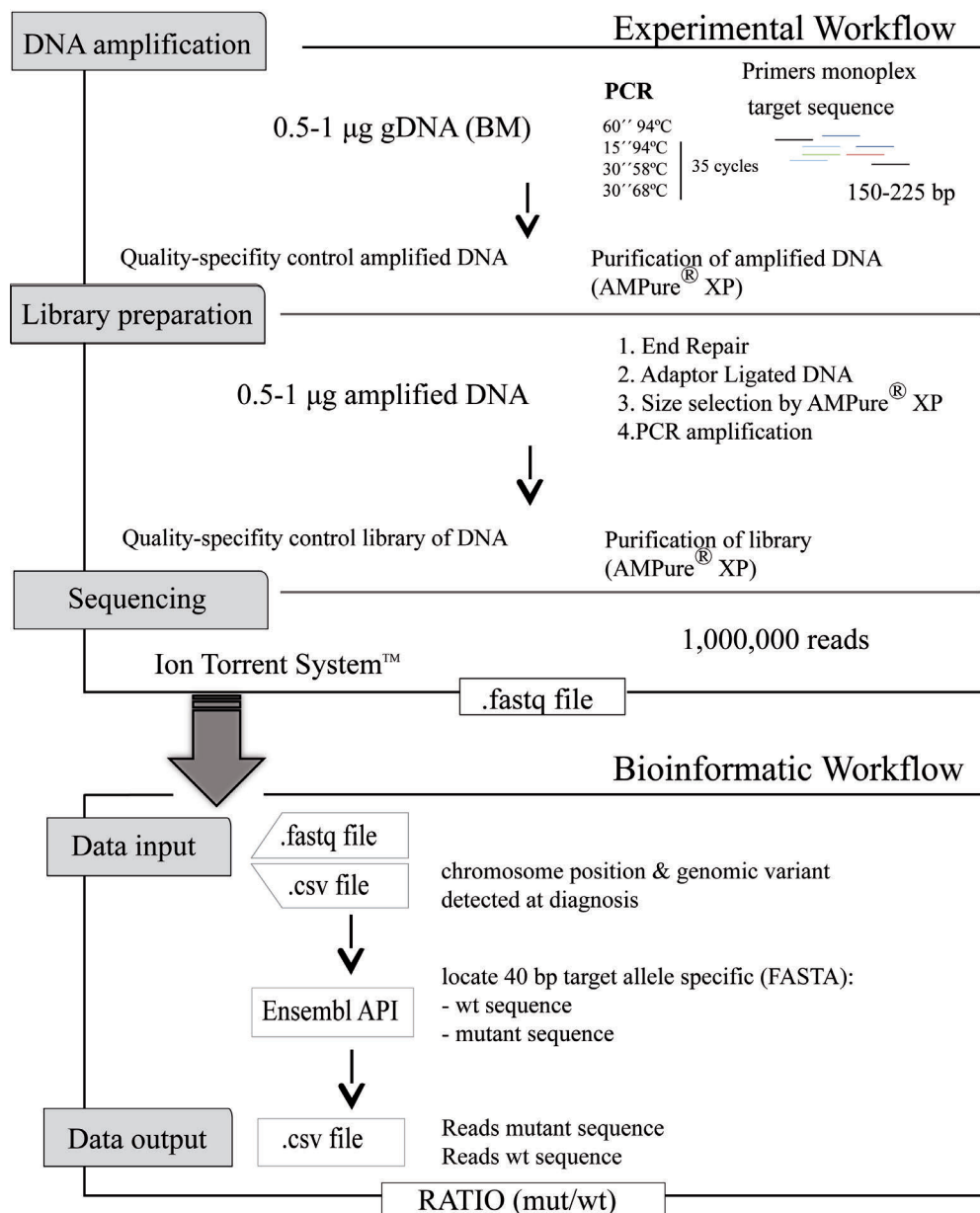


Figure 1. Workflow of the next-generation sequencing – minimal residual disease method. DNA amplification, library preparation and sequencing experimental workflow. Genomic DNA (gDNA) is amplified by quantitative (q) polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Libraries are prepared in four steps: end repair, adaptor ligation, size selection, and PCR amplification. The libraries are then sequenced. A customized bioinformatic pipeline analyzes the sequences obtained. The results are expressed as a ratio of mutated sequences (mut) among wild-type (wt) sequences.

in those with MRD positive status determined by NGS (HR: 4.54; $P=0.005$). The risk of relapse was higher only in patients who were MRD positive as determined by NGS (HR: 3.76; $P=0.012$).

Minimal residual disease assessment by sequencing predicts overall survival and disease-free survival better than multiparameter flow cytometry or quantitative polymerase chain reaction analysis

A positive correlation was found when comparing MRD assessment by NGS versus MFC ($r=0.47$, $P=0.005$, $n=75$), and NGS versus qPCR ($r=0.62$, $P<0.001$, $n=80$) (Online Supplementary Figure S2). There were differences between positive MRD and negative MRD groups of patients tested by MFC, but they were not significant for either overall survival ($P=0.193$) or disease-free survival ($P=0.117$) ($n=46$) (Figure 4A). Similarly, differences were observed between positive MRD and negative MRD groups defined by qPCR of *NPM1*, although statistical significance was not reached for either overall survival ($P=0.212$) or disease-free survival ($P=0.086$) ($n=46$) (Figure 4B).

Discussion

We have optimized and validated a high sensitivity NGS method for the detection and quantification of *NPM1*, *IDH1*, *IDH2* and *FLT3*-SNV mutated sequences at very low allele frequency in follow-up gDNA samples. NGS has demonstrated prognostic value for pre-treatment status in patients with AML,¹⁷ and may also be a useful tool for detecting MRD.^{18,19} We first studied the mutational profile of patients with AML using a customized NGS panel to ensure a high applicability (82% of patients). This approach is also a useful screening method for detecting all potential MRD markers and choosing those most relevant. The combination of several markers is possible and recommended to overcome limitations of MRD assessment due to sub-clonal heterogeneity of AML and CHIP.¹¹ Accordingly, our method has the capacity to evaluate multiple markers simultaneously and, considering that 61% of patients in our cohort had two or more genetic alterations, this approach is sufficiently robust to monitor MRD even in patients with clonal evolution.

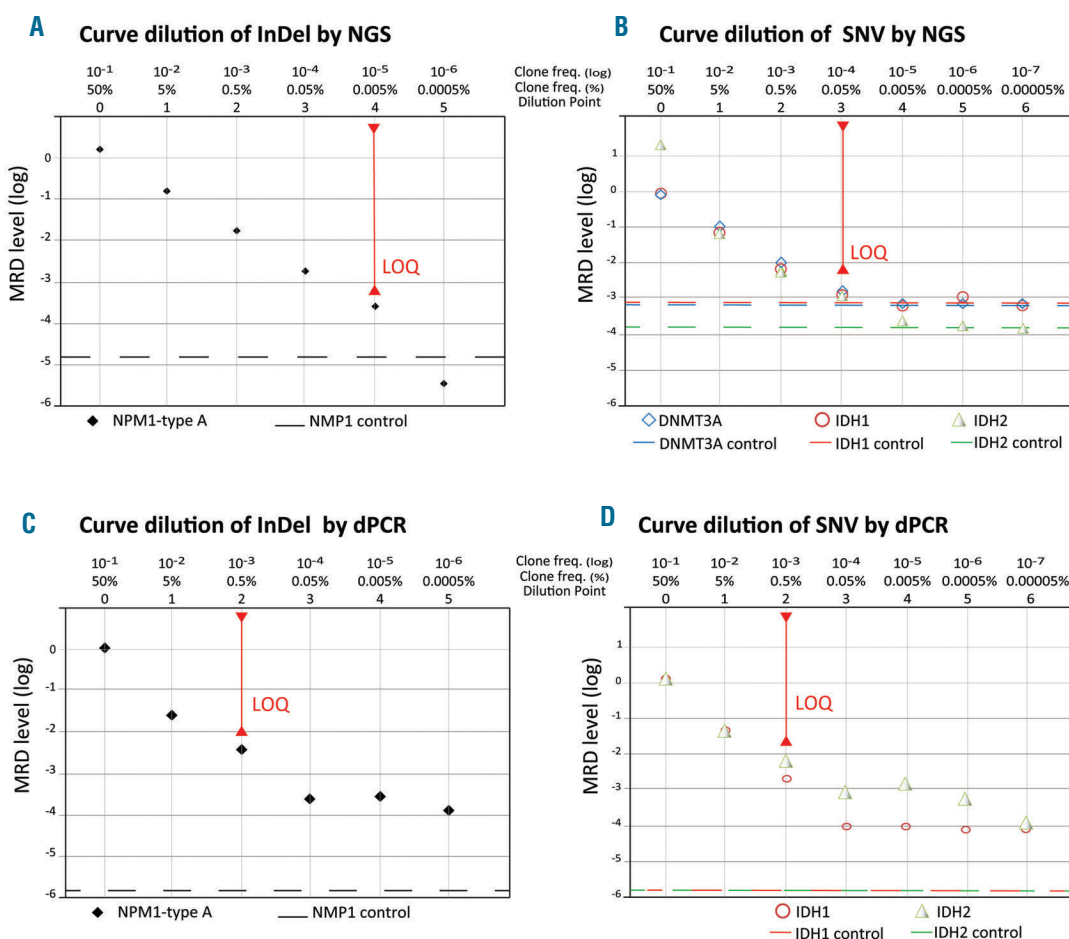


Figure 2. Calibration curve of minimal residual disease in serial dilutions. (A,B) Ten-fold dilution curves for the assessment of the sensitivity of next-generation sequencing (NGS) in (A) insertions-deletions (InDel), using OCI-AML3 gDNA with 50% *NPM1* type A mutation ($R^2 = 0.98$); and (B) single nucleotide variants (SNV), using OCI-AML3 gDNA with 50% mutated *DNMT3A* ($R^2 = 0.98$), and gDNA with 50% mutated *IDH1* or *IDH2* from a commercial standard ($R^2 = 0.91$ and $R^2 = 0.98$, respectively). (C,D) The same 10-fold dilution curves for the assessment of sensitivity of digital polymerase chain reaction (dPCR) in (C) InDel ($R^2 = 0.98$); and (D) SNV ($R^2 = 0.91$ for *IDH1* and $R^2 = 0.98$ for *IDH2*). The vertical red bars indicate the limit of quantification (LOQ) according to the sample. Clone frequency is expressed as target concentration as mutated copies/ μ L in wild-type copies/ μ L. Negative controls are included in the calibration curves and had levels below the corresponding LOQ values.

Reported variants associated with CHIP are frequently located in *DNMT3A*, *TET2* or *ASXL1* genes, and are detected in the preleukemic phase and during complete AML remission.^{20,23} Indeed, any gene could carry both CHIP and non-CHIP variants, and these should be evaluated for each patient. Moreover, studies have shown that genes related to CHIP (*IDH1/2*) are useful for predicting

prognosis because in these cases the genetic alterations have been acquired in the leukemic clone and not before.²⁴

The sensitivity of this method equates to one mutated cell per 100,000 cells (LOQ 10^{-5}) for *NPM1* and one mutated cell per 10,000 cells (LOQ 10^{-4}) for *IDH1*, *IDH2* and *FLT3*-SNV. This difference in sensitivity is related to the fact that the *NPM1* type A mutation (insCCTG) is rarely

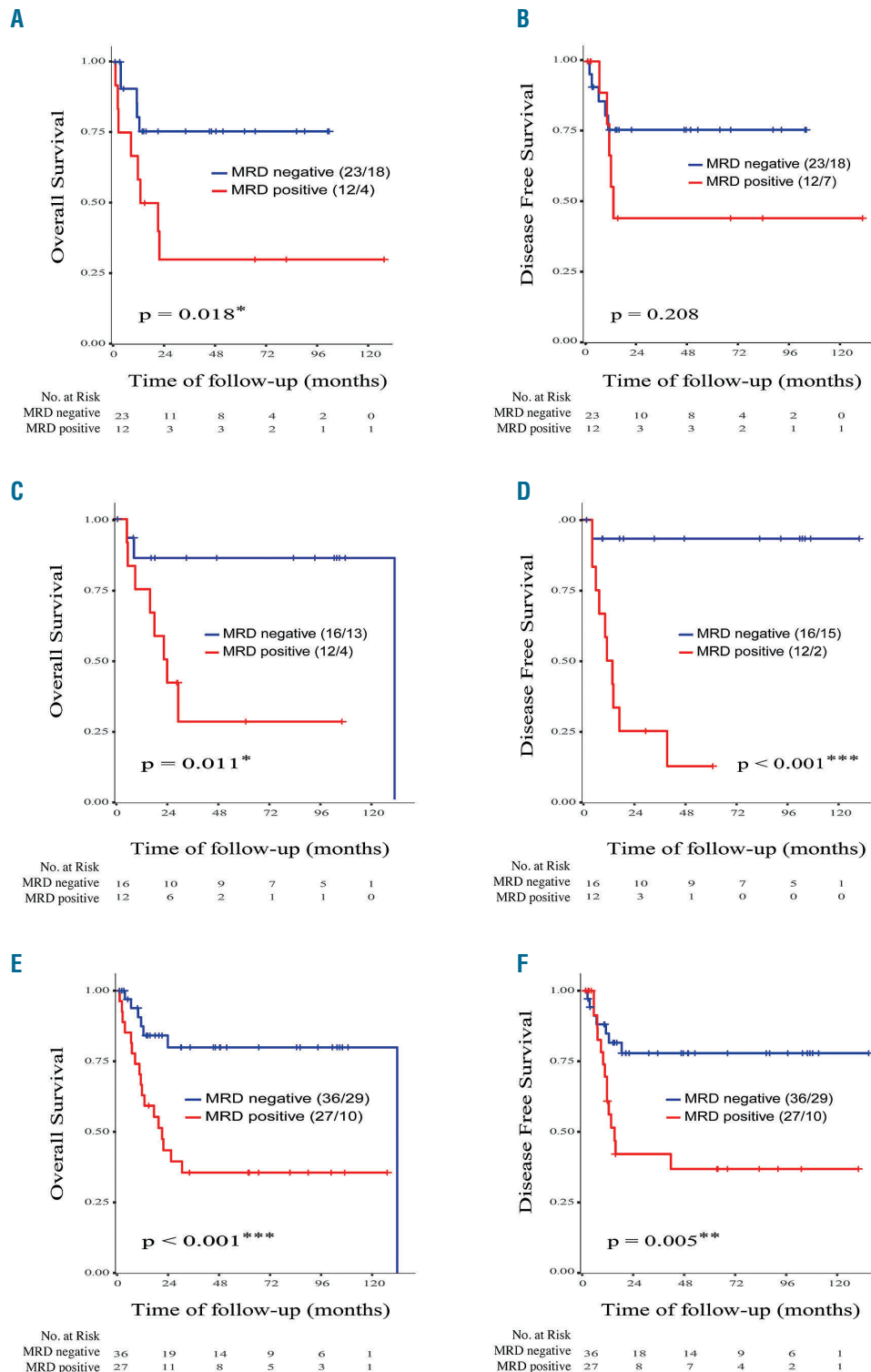


Figure 3. Analysis of overall survival and disease-free survival in patients with acute myeloid leukemia stratified according to minimal residual disease levels determined by sequencing. Analysis of overall survival for (A) the induction data set, (C) the consolidation data set, and (E) both together. Analysis of disease-free survival for (B) the induction data set, (D) the consolidation data set, and (F) both together. The cutoff used for overall and disease-free survival was 0.001 at the post-induction check-point ($n=35$), 0.00026 at the post-consolidation check-point ($n=28$) and 0.00035 for both check-points (all data set) ($n=63$). The numbers of censored patients with respect to the stratified groups and the numbers at risk are indicated. Statistically significant values: $*P<0.05$, $**P<0.01$.

Table 2. Cox regression analyses.

A.

	Risk of death		Risk of relapse	
	HR (95%CI)	P value	HR (95%CI)	P value
Sex (female <i>vs.</i> male)	1.20 (0.50–2.83)	0.682	0.94 (0.37–2.44)	0.906
Age per year	1.04 (1.00–1.07)	0.013 *	1.03 (0.99–1.06)	0.069
Blasts at diagnosis (%)	1.00 (0.99–1.02)	0.667	1.01 (0.99–1.03)	0.532
Leukocytes at diagnosis ($\times 10^9/L$)	1.01 (0.99–1.01)	0.418	1.00 (0.99–1.01)	0.508
Favorable <i>vs.</i> adverse ELN risk	0.67 (0.08–5.43)	0.714	0.75 (0.09–6.00)	0.786
Intermediate <i>vs.</i> adverse ELN risk	1.03 (0.13–7.86)	0.976	1.02 (0.13–7.82)	0.988
Mutated <i>FLT3</i> -ITD	3.45 (1.40–8.52)	0.007 *	2.37 (0.86–6.51)	0.095
Allo-HSCT <i>vs.</i> intensive chemotherapy	1.35 (0.40–4.57)	0.634	1.78 (0.41–7.78)	0.44
Allo-HSCT <i>vs.</i> auto-HSCT	0.29 (0.05–1.74)	0.176	0.64 (0.11–3.77)	0.629
MRD ⁺ by MFC	2.10 (0.67–6.62)	0.203	2.40 (0.77–7.46)	0.130
MRD ⁺ by qPCR	2.51 (0.56–11.2)	0.228	5.01 (0.64–38.8)	0.123
MRD ⁺ by NGS	4.22 (1.66–10.7)	0.002 **	3.41 (1.37–8.48)	0.008 **

B.

	Risk of death		Risk of relapse	
	HR (95%CI)	P value	HR (95%CI)	P value
Age per year	1.05 (1.02–1.09)	0.004 *	1.03 (0.99–1.07)	0.061
Sex (female <i>vs.</i> male)	0.84 (0.33–2.17)	0.720	1.25 (0.44–3.52)	0.671
Leukocytes at diagnosis ($\times 10^9/L$)	1.01 (0.99–1.03)	0.219	1.07 (0.99–1.02)	0.481
Favorable <i>vs.</i> adverse ELN risk	13.75 (0.84–226.1)	0.067	7.09 (0.37–134.15)	0.192
Intermediate <i>vs.</i> adverse ELN risk	11.22 (0.82–154.2)	0.071	5.86 (0.39–86.84)	0.203
Mutated <i>FLT3</i> -ITD	8.87 (2.54–30.95)	0.001 **	4.18 (1.11–15.69)	0.034*
MRD ⁺ by NGS	4.54 (1.58–13.03)	0.005 **	3.76 (1.34–10.54)	0.012*

Cox regression analyses of prognostic factors influencing the risk of relapse and risk of death of patients with acute myeloid leukemia. (A) Univariate Cox regression analysis of each prognostic factor. (B) Multivariate Cox regression analysis evaluating the most relevant factors detected in the univariate analyses. HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval; ITD: internal tandem duplication; ELN: European LeukemiaNet; allo-HSCT: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; auto-HSCT: autologous hematopoietic stem cell transplantation; MFC, multiparametric flow cytometry; MRD, minimal residual disease; NGS, next-generation sequencing. Statistically significant values: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

generated erroneously by NGS, and the quantification is precise.

Our method, as with any NGS method, has an intrinsic error rate that limits its sensitivity for most SNV to 1–2% of all reads. This limitation can nevertheless be overcome by virtue of the scalable nature of NGS.¹⁶ Thus, we boosted NGS sensitivity by increasing the amount of DNA by PCR prior to sequencing, which increased the depth of coverage to one million reads. By also optimizing the bioinformatic analysis, we focused the search for the precise variant in order to eliminate random sequencing errors, enhancing the specificity of the technique and reducing the computational time. To the best of knowledge, our NGS method presents possibly the highest sensitivity reported for NGS in AML.^{18,19,24–27}

dPCR is a relatively novel technique for precise and absolute quantification of nucleic acids, which is based on limiting partitions of the PCR volume and Poisson statistics.²⁸ It is also an extremely sensitive technique, with a high specificity due to the detection of mutant alleles.²⁹ However, when we compared the same standard dilutions in NGS and dPCR, NGS afforded a 2-log increment in LOQ for indels (*NPM1*) and a 1-log increment for SNV (*IDH1/2*), with the sensitivity of dPCR for indels being similar to that reported in a previously published study

(10^{-2}).³⁰ Compared with NGS, dPCR is a faster measurement technique but, as it is focused, it requires allele-specific primers that can complicate the experimental procedure, and a high number of parallel experiments are needed to raise the sensitivity, which increases the cost of the assay. Additionally, although it is possible to multiplex dPCR, unfortunately only a few targets can be monitored simultaneously within each sample.²⁹ Another advantage of NGS technology is that it does not require calibration curves in each assay, and the results are reported in absolute values, facilitating its standardization.

The NGS method described here showed comparable sensitivities (10^{-4} for SNV and 10^{-5} for indels) to those of MFC methods in those cases with immunophenotypically aberrant populations.^{10,31} Although our method had a similar sensitivity to that of qPCR, it does not require oligonucleotides that hybridize specifically to a particular sequence, so all nucleotides in the amplified region can be studied. Consequently, the NGS test is capable of detecting all *NPM1* subtype mutations in the same assay.

We found positive correlations when MRD levels were evaluated by NGS *versus* MFC and *versus* qPCR, but not with the expected results. In the case of MFC, this could be explained, in part, by the fact that *NPM1* mutations are

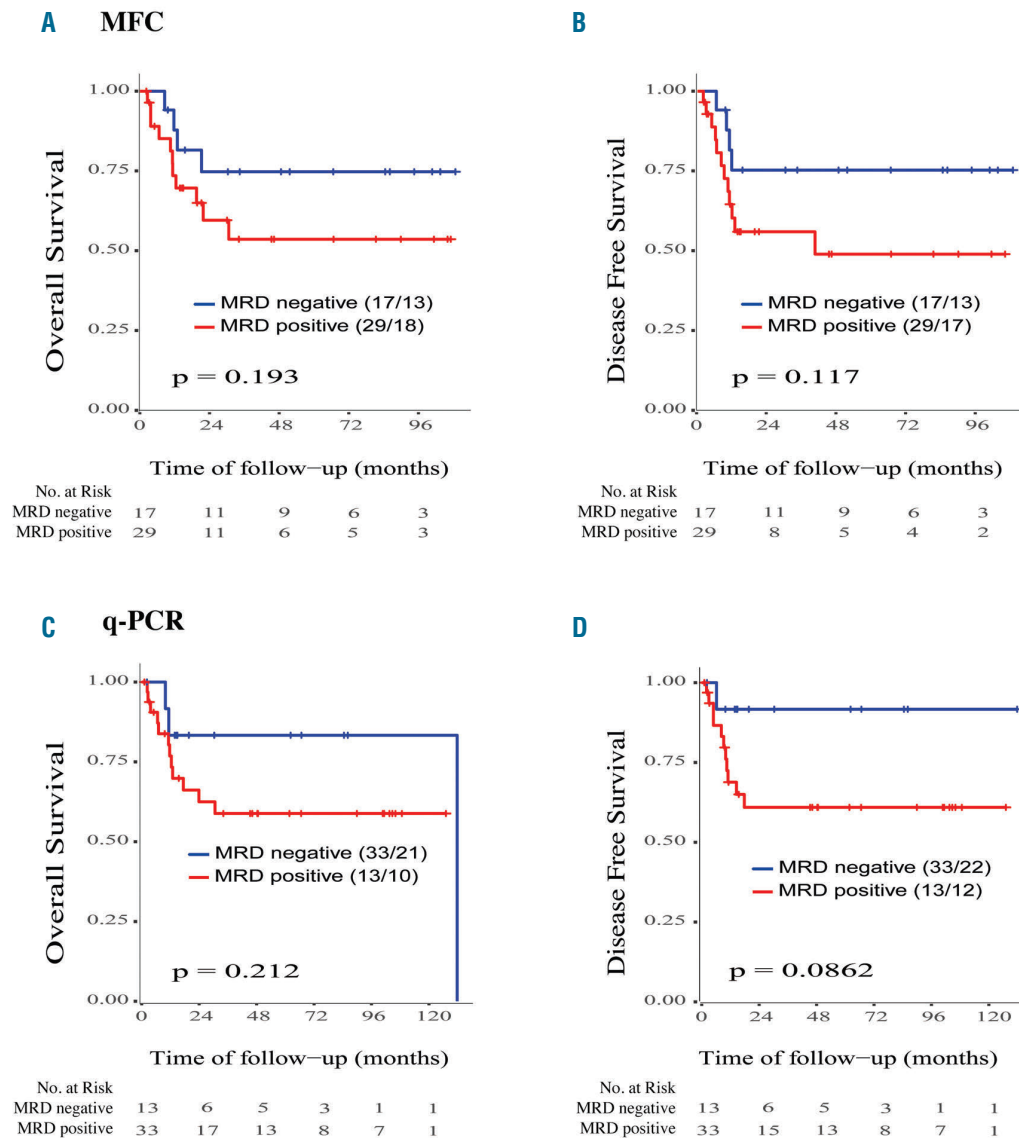


Figure 4. Analysis of overall survival and disease-free survival in patients with acute myeloid leukemia stratified according to minimal residual disease levels determined by conventional methods. Kaplan-Meier plots of (A) overall survival and (B) disease-free survival according to minimal residual disease (MRD) assessment by multiparametric flow cytometry (MFC) and (C) overall survival and (D) disease-free survival according to MRD assessment by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis. The numbers of censored patients with respect to each stratified group and numbers at risk are indicated. Statistically significant values: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

usually associated with monocytic subtype-AML, which frequently presents more difficulties for identifying MRD by MFC. Indeed, Salipante *et al.*²⁷ described that the level of success of MFC depends greatly on the immunophenotype of the abnormal blasts and how to discriminate them from background regenerative blasts. Moreover, due to the lack of standardization, MFC shows substantial variability across laboratories, including that of sample processing, instrument configuration, number of events, and training of pathologists.³² The lack of a strong correlation between NGS and qPCR could be explained by the nature of the sample (sequencing uses gDNA whereas qPCR uses cDNA). Although RNA overexpression allows a higher sensitivity of detection, RNA levels do not correlate with the number of tumor cells, in contrast to mutated DNA.

Accordingly, mutated DNA is more representative of the tumor burden than is overexpression of mutated RNA.³⁵ It should be noted that the prediction of survival and progression of AML using MRD NGS was better than that of the other methodologies employed, at least in the cohorts evaluated.

Finally, survival analysis showed that MRD positive status determined by NGS was associated with a higher risk of relapse and death and that MRD negative status in post-consolidation samples was associated with longer overall and disease-free survival, in accordance with recently published studies.²³ Supporting these findings, previous studies reported that an MRD check-point after consolidation could be the best moment for analysis because it afforded better prediction.^{8,34-37} Cox regression multivariate analyses

confirmed that MRD positive status determined by sequencing was the only statistically significant predictor of the risk of relapse ($P=0.012$).

In conclusion, we have optimized a new targeted sequencing method with high sensitivity for MRD evaluation with applicability in a high percentage of AML patients, improving the capacity, over MFC or qPCR, to predict the survival outcomes of the AML patients in our cohort.

Acknowledgments

This study was supported by the Subdirección General de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Spain) grants PI13/02387 and PI16/01530, and the CRIS against Cancer foundation grant 2014/0120. ML holds a postdoctoral fellowship of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FPDI-2013-16409). PRP holds a postdoctoral fellowship of the Spanish Instituto de Salud Carlos III: Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud i-PFIS (IFI 14/00008).

References

- Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447.
- Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21(24):4642-4649.
- Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152.
- Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N Engl J Med*. 2016;374(5):422-433.
- Kronke J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2709-2716.
- Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(6):543-552.
- Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction minimal residual disease predicts outcome and benefit from allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation: a study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2017;35(2):185-193.
- Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood*. 2013;121(20):4056-4062.
- Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(32):4123-4131.
- Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SARK AML 42A study. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3889-3897.
- Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-1291.
- Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):222-233.
- Cedena MT, Rapado I, Santos-Lozano A, et al. Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017;8(63):106948-106961.
- Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103-1108.
- McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol*. 2016;17(1):122.
- Tomlinson B, Lazarus HM. Enhancing acute myeloid leukemia therapy - monitoring response using residual disease testing as a guide to therapeutic decision-making. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(6):563-574.
- Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-1089.
- Thol F, Kolking B, Damm F, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(7):689-695.
- Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014;28(1):129-137.
- Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686-698.
- Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-946.
- Koeffler HP, Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia*. 2017;31(3):534-542.
- Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1189-1199.
- Klco JM, Miller CA, Griffith M, et al. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*. 2015;314(8):811-822.
- Getta BM, Devlin SM, Levine RL, et al. Multicolor flow cytometry and multigene next-generation sequencing are complementary and highly predictive for relapse in acute myeloid leukemia after allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(7):1064-1071.
- Debarri H, Lebon D, Roumier C, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget*. 2015;6(39):42345-42353.
- Salipante SJ, Fromm JR, Shendure J, et al. Detection of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Mod Pathol*. 2014;27(11):1438-1446.
- Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, et al. Droplet digital PCR is a reliable tool for monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *J Mol Diagn*. 2017;19(3):437-444.
- Roloff GW, Lai C, Hourigan CS, et al. Technical advances in the measurement of residual disease in acute myeloid leukemia. *J Clin Med*. 2017;6(9).
- Minervini A, Francesco Minervini C, Anelli L, et al. Droplet digital PCR analysis of NOTCH1 gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(52):86469-86479.
- Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):356-365.
- Cruz NM, Mencia-Trinchant N, Hassane DC, et al. Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2017;39 (Suppl 1):53-60.
- Duployez N, Nibourel O, Marceau-Renaut A, et al. Minimal residual disease monitoring in t(8;21) acute myeloid leukemia based on RUNX1-RUNX1T1 fusion quantification on genomic DNA. *Am J Hematol*. 2014;89(6):610-615.
- Jacobsohn DA, Tse WT, Chaleff S, et al. High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol*. 2009;146(6):669-674.
- Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, et al. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(7):1482-1490.
- Rossi G, Carella AM, Minervini MM, et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tumor 1 expression. *Leuk Res*. 2015;39(2):138-143.
- Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(12):2213-2223.

support for the investigation of the contribution of altered ribosomal biogenesis to an oncogenic differentiation block.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

JB was supported by a Kay Kendall Leukaemia Fund Intermediate Research Fellowship. The Necker laboratory is supported by the Association Laurette Fugain, La Ligue Contre le Cancer and the INCa CAMELE Translational Research and PhD programs. The Fumagalli laboratory is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche and from the Fondation ARC Pour la Recherche sur le Cancer. The Martens laboratory was supported by the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 282510-BLUEPRINT and the Dutch Cancer Foundation (KUN 2011-4937).

G Cordonnier^{1,2}, A Mandoli^{3,5}, A Radhouane^{1,5}, G Hypolite^{1,2},
L Lhermitte^{1,2}, M Belhocine⁴, V Asnafi^{1,2}, E Macintyre^{1,2},
JHA Martens³, S Fumagalli¹ and J Bond^{1,2}

¹Université Paris Descartes Sorbonne Cité, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1151, Paris, France;

²Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France;

³Department of Molecular Biology, Faculty of Science, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands and

⁴Technological Advances for Genomics and Clinics (TAGC), INSERM U1090, Aix-Marseille University UMR-S 1090, Marseille, France
E-mail: stefano.fumagalli@inserm.fr or jonathan.bond@inserm.fr

⁵These authors contributed equally to this work.

REFERENCES

- 1 Young DW, Hassan MQ, Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Lee SH et al. Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature* 2007; **445**: 442–446.

- 2 Ali SA, Zaidi SK, Dacwag CS, Salma N, Young DW, Shakoobi AR et al. Phenotypic transcription factors epigenetically mediate cell growth control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 6632–6637.
- 3 Cai X, Gao L, Teng L, Ge J, Oo ZM, Kumar AR et al. Runx1 deficiency decreases ribosome biogenesis and confers stress resistance to hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 2015; **17**: 165–177.
- 4 Bakshi R, Zaidi SK, Pande S, Hassan MQ, Young DW, Montecino M et al. The leukemogenic t(8;21) fusion protein AML1-ETO controls rRNA genes and associates with nucleolar-organizing regions at mitotic chromosomes. *J Cell Sci* 2008; **121** (Pt 23): 3981–3990.
- 5 Lopez-Camacho C, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein JL, Stein GS. CBFbeta and the leukemogenic fusion protein CBFbeta-SMMHC associate with mitotic chromosomes to epigenetically regulate ribosomal genes. *J Cell Biochem* 2014; **115**: 2155–2164.
- 6 Liu PP, Hajra A, Wijnga C, Collins FS. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995; **85**: 2289–2302.
- 7 Lutterbach B, Hou Y, Durst KL, Hiebert SW. The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12822–12827.
- 8 Mandoli A, Singh AA, Jansen PW, Wierenga AT, Riahi H, Franci G et al. CBFbeta-MYH11/RUNX1 together with a compendium of hematopoietic regulators, chromatin modifiers and basal transcription factors occupies self-renewal genes in inv(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014; **28**: 770–778.
- 9 Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 2012; **485**: 109–113.
- 10 Fumagalli S, Thomas G. The role of p53 in ribosomopathies. *Semin Hematol* 2011; **48**: 97–105.
- 11 Armistead J, Triggs-Raine B. Diverse diseases from a ubiquitous process: the ribosomopathy paradox. *FEBS Lett* 2014; **588**: 1491–1500.
- 12 Ramagopal S, Ennis HL. Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3083–3087.
- 13 Agrawal MG, Bowman LH. Transcriptional and translational regulation of ribosomal protein formation during mouse myoblast differentiation. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4868–4875.
- 14 Gao R, Chen S, Kobayashi M, Yu H, Zhang Y, Wan Y et al. Bmi1 promotes erythroid development through regulating ribosome biogenesis. *Stem Cells* 2015; **33**: 925–938.
- 15 Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR et al. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2014; **24**: 165–169.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

OPEN

Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma

Leukemia (2017) **31**, 1446–1449; doi:10.1038/leu.2017.58

The first step for the cure of multiple myeloma (MM) is to achieve a complete response (CR);^{1,2} however, regardless of CR improvement, most patients experience disease progression or relapse in part due to the persistence of low levels of clonal plasma cells after treatment (minimal residual disease (MRD)).³ In addition, many patients who achieve MRD-negative status also relapse, indicating that the sensitivity and specificity of traditional techniques for MRD assessment can be improved.⁴ At

present, multiparameter flow cytometry (MFC), allele-specific oligonucleotide PCR and high-throughput sequencing (NGS) are the three high-sensitivity techniques available for MRD quantification in MM.^{3,5,6} A growing body of evidence strongly suggests that detection of subclinical levels of MRD with this high-sensitivity methods provides powerful independent prognostic information.^{7,8} MFC is the most widely available technique with excellent sensitivity and applicability; however, there is variability in sensitivity, panels and performance between laboratories, and requires high level of expertise.⁹ On the other hand, in previous work, we have shown that NGS of immunoglobulin (IG)

Accepted article preview online 17 February 2017; advance online publication, 10 March 2017

rearranged genes is an effective technology to identify and quantify pathological clonal cells in MM with a sensitivity of at least 0.001%.^{7,10} However, this NGS technology is a proprietary multiplex PCR that is performed at centralized laboratories increasing the turn-around time for the results. Furthermore, the NGS

method for MRD quantification in MM needs additional clinical validation to prove its utility for patient risk stratification, as well as to evaluate the efficacy of different treatment schemes.

In the present study, we describe and analytically validate a simplified in-house deep-sequencing method to identify and quantify MRD in MM patients from 1 µg of DNA. The method uses the standardized primers developed by the Biomed-2 concerted action to amplify all IGH or IGK sequences in a patient sample.¹¹ Libraries were prepared by ligation of specific adaptor oligos and sequenced either on an Ion S5 (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, USA) or on a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA). The sequencing data were analyzed with a set of specific mathematical and bioinformatics tools to identify and quantitate the clone-specific sequence (clonotype) present on each sample (code patent pending). A clonotype was identified when at least 400 identical sequencing reads were obtained, or was present at a frequency of >1%.

We analyzed MRD by deep sequencing in bone marrow (BM) samples from 73 MM patients of which DNA was available for testing (Bioproject PRJNA360043). Patients were enrolled in the phase 2 trial for newly diagnosed elderly MM patients PETHEMA/GEM2010MAS65 study (www.clinicaltrials.gov as #NCT01237249); patients were randomized to receive 9 cycles of bortezomib/

melphalan/prednisone (VMP) followed by 9 cycles of lenalidomide/dexamethasone (Rd; sequential arm, $n=38$) vs 18 alternating cycles of VMP/Rd (alternating arm, $n=35$).¹² Ninety-five percent ($n=69$) of the patients experienced a CR according to the International Myeloma Working Group (IMWG).¹³ Median follow-up of the series was 3 years.

Statistical analyses were performed with the SPSS program version 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Linear regression was used to compare different dilutions of the DNA samples. The Spearman correlation coefficient was used to compare MFC data with NGS data. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were estimated by Kaplan–Meier survival analysis and statistical differences assessed via log-rank and Wilcoxon analyses.

With our approach of deep sequencing, a clonotype was detected in the 97% (71 out of 73) of MM patients, indicating a specificity similar to the clinical specificity reported in the original validation studies of the Biomed-2 method (98%),¹¹ slightly higher to the previously described NGS assay for IG quantification (91%),⁷ and comparable to 8c-MFC.⁸ Clonotypes were not detected in normal tonsil and BM samples, indicating the high specificity of the assay. This method also presents a very good analytical sensitivity of at least 10^{-5} , as determined from a 10-fold dilution curve of commercial control monoclonal and polyclonal DNAs (Figure 1a). With the same primer combinations, the analytical sensitivity of Biomed-2 amplification to detect a clonal population was 10^{-2} for IGH and IGK,¹¹ consequently, applying deep-sequencing technologies to the Biomed-2 design highly improves the sensitivity of clonal identification. In addition, the method also shows high reproducibility between runs and different NGS platforms

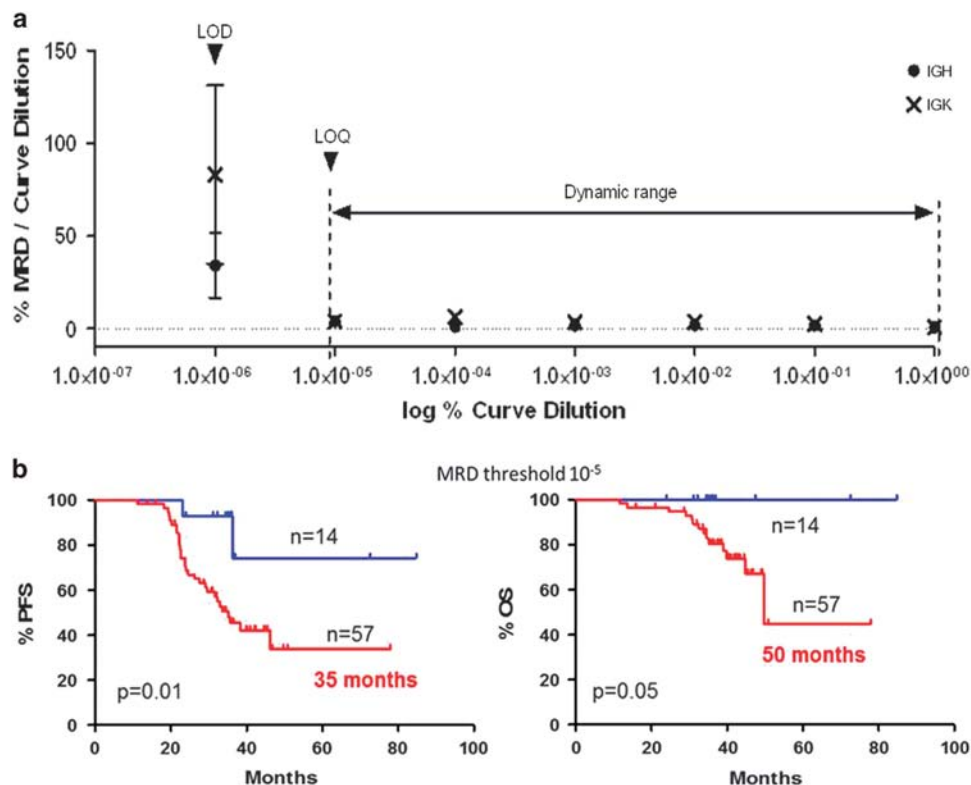


Figure 1. Performance characteristics of the NGS assay. (a) Plot of the dynamic range, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) of the method from a 10-fold dilution curve. The vertical axis represents the ratio of MRD values to curve dilution and the horizontal axis represents the logarithm value for curve dilution. $R^2 = 0.98$ and 0.96 for IGH and IGK genes, respectively, $P < 0.0001$. (b) Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) plots according to MRD levels. MRD-negative values (blue) and MRD-positive values (Red). The threshold for negative values was 10^{-5} .

(99.2%, 91 samples tested in duplicate in different sequencing runs), and is very precise for samples with MRD-negative values (median CV 8.1%, range 3.9–39).

As demonstrated in several trials, a prolonged therapy is an effective approach to improve survival in elderly patients. This was the basis for the 18 cycles explored in the GEM10mas65 clinical trial (VMP+Ld combination), which yielded excellent clinical results.^{12,14} When we analyzed the molecular response in these elderly MM patients, we found that the proportion of patients achieving an MRD-negative status is significantly higher after 18 cycles of treatment (27% ($n=19$) vs 11.5% ($n=8$) after 18 and 9 cycles, respectively, $P=0.04$), confirming that a prolonged treatment improves the rate of molecular responses. Similar to the data obtained with other MRD methods,^{7,8,15} the achievement of molecular responses measured by our NGS method is able to predict 3-year survival in patients enrolled in the GEM10 clinical trial. Median PFS was 35 months vs not reached for patients with MRD-positive and -negative values, respectively (hazard ratio (HR)=2.76, 95% confidence interval (CI) 1.21–6.25, $P=0.01$; Figure 1b). Median OS was also prolonged in MRD-negative patients compared with MRD-positive patients, with 3-year OS rates of 100% and 45%, respectively (median OS of 50 months vs not reached respectively, HR=3.66, 95% CI 0.98–13.67, $P=0.05$). Hence, achieving a molecular response as determined by this new deep-sequencing method results in improved PFS and OS.

The high efficacy of the treatment based on VMP and Rd in a sequential or alternating scheme (CR rates of 42% and 40%, and PFS of 74% and 80%, respectively) was demonstrated previously.^{8,12} In our present study, when we applied the NGS method to assess MRD negativity, more patients in the sequential treatment than in the alternating arm achieved a molecular

response (36% ($n=13$) vs 20% ($n=7$), respectively). Nonetheless, we observed no significant difference in OS between both treatment arms. Taken together, the data show that patients could not only benefit from a prolonged treatment of 18 cycles but also suggest that 18 cycles of treatment in a sequential scheme can be associated with higher number of molecular responses and prolonged PFS. However, these results should be interpreted carefully because the low number of patients analyzed in the study, and further testing is needed in order to draw stronger conclusions.

Sixty-six of these patients were also analyzed for MRD by MFC using an eight-color monoclonal antibody combination.⁸ The levels of MRD obtained with our method have a high degree of correlation with those assessed by 8c-MFC (total 66 patients, $n=175$ samples, Spearman coefficient $R=0.7917$, $P<0.0001$; $n=109$ post-treatment samples, $R=0.6388$, $P<0.0001$), with a global 89% concordance between MFC and NGS data (Figure 2a). Accordingly, there were no significant differences in terms of PFS and OS between the data obtained by our in-house method and MFC. Nevertheless, patients with discordant results between these two technologies, show an intermediate median PFS (46 months) as compared to double-positive (32 months) or double-negative (not reached) MRD values ($P=0.0063$; Figure 2b). At the time of the analysis, the OS for patients with discordant results was similar to that of NGS MRD-negative patients (not reached) versus a median of 50-month survival for MRD-positive patients ($P=0.0835$).

Due to the need of new response criteria that allows the identification of deeper responses than the now defined as clinical CR, the International Myeloma Working Group (IMGW) has defined new response categories of MRD negativity.¹³ One of them is

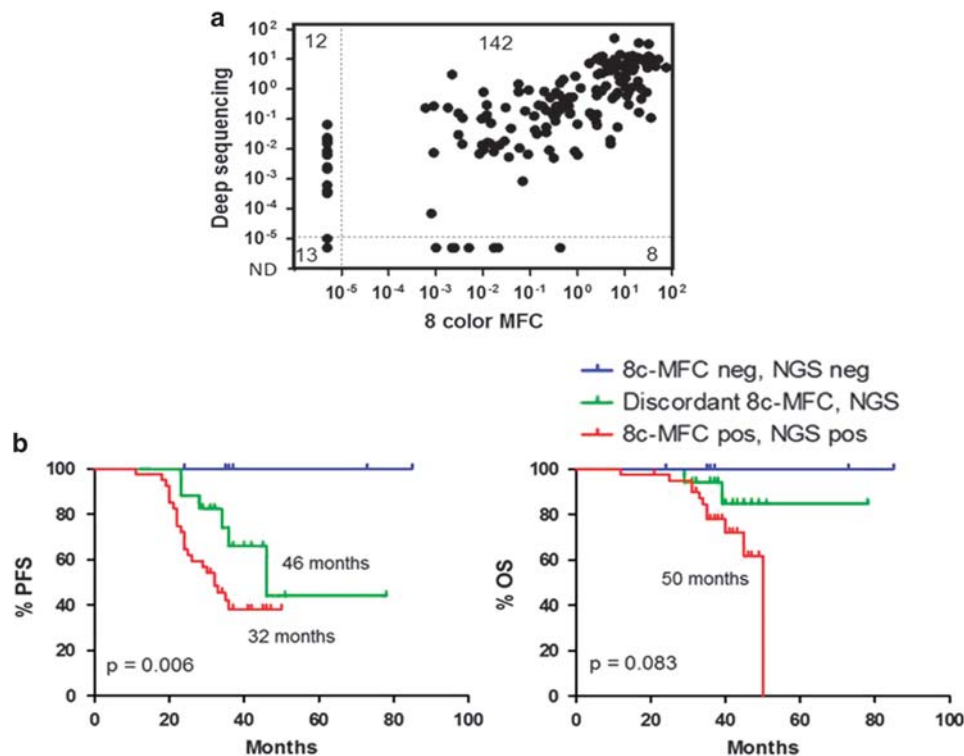


Figure 2. Comparison between deep-sequencing (NGS) and multiparameter flow cytometry (8c-MFC) data. (a) Scatter plot showing correlation of MRD values between deep sequencing and eight-color MFC. Numbers on upper left and lower right indicates samples with discordant results. Spearman correlation coefficient $R=0.7917$, $P<0.0001$. (b) Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) plots of patients grouped according to concordance of MRD levels between NGS and 8c-MFC. Data corresponds to patients with MRD-negative values ($\text{MRD} < 10^{-5}$) by both methods (blue); MRD-positive values ($\text{MRD} > 10^{-5}$) by both methods (red); and MRD with discrepant data between NGS and 8c-MFC (green).

sequencing MRD negative, reflecting the importance of the sensitivity of deep-sequencing methodology applied to the detection of very low numbers of tumor cells. In the new criteria, the IMGW recommends both deep-sequencing or next-generation flow to assess MRD in the BM, depending on the availability of the techniques at each center. As shown in the high degree of correlation of this study, this new method to measure MRD in MM by deep sequencing could be used to define MRD negativity by sequencing as defined in the new criteria of the IMWG.

In summary, our data confirm the clinical application of quantifying MRD levels by our in-house deep-sequencing method in MM patients. Our method shows a high analytical reproducibility and can be implemented in any laboratory with NGS capability, can be applied to the majority of MM patients with a short turn-round time, has a sensitivity of 10^{-5} and can be fully automated (from DNA extraction to data analysis), and thus easily standardized minimizing lab-to-lab variation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Cooperative Research Thematic Network grant RD12/0036/0061 of the Red de Cancer (Cancer Network of Excellence RTICC); the Subdirección General de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Spain) grants PI15/02062 and PI15/01484; the CRIS against Cancer foundation grant 2014/0120; Joan Rodés grant (JR 14/00016); and Undergraduate Fellowship IF114/00008.

J Martínez-López^{1,11}, B Sánchez-Vega^{1,11}, S Barrio², I Cuenca¹, Y Ruiz-Heredia¹, R Alonso¹, I Rapado¹, C Marin¹, M-T Cedena¹, B Paiva³, N Puig⁴, M-V Mateos⁴, R Ayala¹, M-T Hernández⁵, C Jimenez⁴, L Rosiñol⁶, R Martínez⁷, A-I Teruel⁸, N Gutiérrez⁴, M-L Martín-Ramos¹, A Oriol⁹, J Bargay¹⁰, J Blade⁶, J San-Miguel³, R García-Sanz⁴ and J-J Lahuerta¹

¹Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain;

²Department of Hematology, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany;

³Department of Hematology, Clínica Universidad de Navarra, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), IDISNA, Pamplona, Spain;

⁴Department of Hematology, Hospital Universitario, Salamanca, Spain;

⁵Department of Hematology, Hospital Universitario de Canarias, Santa Cruz de Tenerife, Spain;

⁶Department of Hematology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain;

⁷Department of Hematology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain;

⁸Department of Hematology, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain;

⁹Department of Hematology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain and

¹⁰Department of Hematology, Hospital Sont Llatzer, Palma de Mallorca, Spain
E-mail: jmarti01@umc.es

¹¹These authors contributed equally to this work.

This study has been presented in part at the Annual Meeting of the American Society of Hematology in 2015 (Orlando, FL, USA) and at the 20th Congress of European Hematology Association (EHA) in 2015 (Vienna, Austria).

REFERENCES

- Martínez-López J, Blade J, Mateos M-V, Grande C, Alegre A, García-Laraña J *et al.* Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood* 2011; **118**: 529–534.
- Gay F, Larocca A, Wijermans P, Cavallo F, Rossi D, Schaafsma R *et al.* Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood* 2011; **117**: 3025–3031.
- Paiva B, Gutiérrez NC, Rosiñol L, Vidriales M-B, Montalbán M-Á, Martínez-López J *et al.* High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2012; **119**: 687–691.
- Martínez-López J, Paiva B, López-Anglada L, Mateos M-V, Cedena T, Vidriales M-B *et al.* Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood* 2015; **126**: 858–862.
- Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, Lendvai N, Hassoun H, Stetler-Stevenson M *et al.* Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; **12**: 286–295.
- Martínez-López J, Fernández-Redondo E, García-Sanz R, Montalbán MA, Martínez-Sánchez P, Pavia B *et al.* Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study. *Br J Haematol* 2013; **163**: 581–589.
- Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepin F, González M, Barrio S, Ayala R *et al.* Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014; **123**: 3073–3079.
- Paiva B, Cedena M-T, Puig N, Arana P, Vidriales M-B, Cordon L *et al.* Minimal residual disease monitoring and immune profiling using second generation flow cytometry in elderly multiple myeloma. *Blood* 2016; **127**: 3165–3174.
- Roschewski M, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Mailankody S, Korde N, Landgren O. Minimal residual disease: what are the minimum requirements? *J Clin Oncol* 2014; **32**: 475–476.
- Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VEH, Stow P, Coustan-Smith E *et al.* Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; **120**: 5173–5180.
- van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
- Mateos M-V, Martínez-López J, Hernández M-T, Ocio E-M, Rosiñol L, Martínez R *et al.* Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood* 2016; **127**: 420–425.
- Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P *et al.* International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; **17**: e328–e346.
- Palumbo A, Mina R, Cerrato C, Cavallo F. Role of consolidation/maintenance therapy in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; **13**(Suppl 2): S349–S354.
- Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L *et al.* Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 2077–2084.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© The Author(s) 2017

Published in final edited form as:

Leukemia. 2017 February ; 31(2): 382–392. doi:10.1038/leu.2016.211.

Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance

B Paiva¹, N Puig², MT Cedena³, BG de Jong⁴, Y Ruiz³, I Rapado³, J Martinez-Lopez³, L Cordon⁵, D Alignani¹, JA Delgado¹, MC van Zelm^{4,6}, JJM Van Dongen⁴, M Pascual¹, X Agirre¹, F Prosper¹, JI Martín-Subero⁷, M-B Vidriales², NC Gutierrez², MT Hernandez⁸, A Oriol⁹, MA Echeveste¹⁰, Y Gonzalez¹¹, SK Johnson¹², J Epstein¹², B Barlogie¹², GJ Morgan¹², A Orfao¹³, J Blade¹⁴, MV Mateos², JJ Lahuerta³, and JF San-Miguel¹ on behalf of GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study groups

¹Clinica Universidad de Navarra, Centro de Investigacion Medica Aplicada (CIMA), IDISNA, Pamplona, Spain ²Hospital Universitario de Salamanca, Instituto de Investigacion Biomedica de Salamanca (IBSAL), Centro de Investigación del Cancer (IBMCC-USAL, CSIC), Salamanca, Spain ³Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain ⁴Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands ⁵Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain ⁶Department of Immunology and Pathology, Monash University, Melbourne VIC Australia ⁷Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain ⁸Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain ⁹Institut Català d'Oncologia, Institut Josep Carreras, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain ¹⁰Hospital de Donostia, San Sebastian, Spain ¹¹Hospital Universitario Josep Trueta, Girona, Spain ¹²Myeloma Institute for Research and Therapy, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA ¹³Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cancer (IBMCC-USAL, CSIC), IBSAL and Department of Medicine, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain ¹⁴Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Abstract

The notion that plasma cells (PCs) are terminally differentiated has prevented intensive research in multiple myeloma (MM) about their phenotypic plasticity and differentiation. Here, we demonstrated in healthy individuals ($n = 20$) that the CD19 – CD81 expression axis identifies three bone marrow (BM)PC subsets with distinct age-prevalence, proliferation, replication-history, immunoglobulin-production, and phenotype, consistent with progressively increased differentiation from CD19+CD81+ into CD19 – CD81+ and CD19 – CD81 – BMPCs.

Afterwards, we demonstrated in 225 newly diagnosed MM patients that, comparing to normal BMPC counterparts, 59% had fully differentiated (CD19 – CD81 –) clones, 38% intermediate-

Correspondence: Professor JF San Miguel, Clinica Universidad de Navarra; Centro de Investigacion Médica Aplicada (CIMA), Av. Pio XII 36, Pamplona 31008, Spain. sanmiguel@unav.es.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

differentiated (CD19 – CD81+) and 3% less-differentiated (CD19+CD81+) clones. The latter patients had dismal outcome, and PC differentiation emerged as an independent prognostic marker for progression-free (HR: 1.7; $P = 0.005$) and overall survival (HR: 2.1; $P = 0.006$). Longitudinal comparison of diagnostic vs minimal-residual-disease samples ($n = 40$) unraveled that in 20% of patients, less-differentiated PCs subclones become enriched after therapy-induced pressure. We also revealed that CD81 expression is epigenetically regulated, that less-differentiated clonal PCs retain high expression of genes related to preceding B-cell stages (for example: PAX5), and show distinct mutation profile vs fully differentiated PC clones within individual patients. Together, we shed new light into PC plasticity and demonstrated that MM patients harbouring less-differentiated PCs have dismal survival, which might be related to higher chemoresistant potential plus different molecular and genomic profiles.

Introduction

Multiparameter flow cytometry (MFC) is currently considered a sensitive co-adjuvant test in the diagnostic screening of patients with multiple myeloma (MM) to demonstrate bone marrow (BM) clonality.¹ Tumour plasma cells (PCs) from virtually all MM patients show phenotypic aberrancies that allow for clear distinction between these and normal PCs;² furthermore, the expression levels of some antigens are significantly associated with differences in outcome.^{3–7} One example is CD19, whose expression has been found in 5–10% of MM cases and correlated with inferior survival;³ however, the biological explanation behind such correlation remains unknown. Recently, we showed that the expression of CD81 in clonal PCs is also an independent prognostic factor in MM,⁴ but similarly to CD19, there is no knowledge on the biologic significance of CD81 expression in the surface of clonal PCs.

Normal PC differentiation is characterized by the acquisition of secretory capacity, cell-cycle exit and changes in both surface phenotype and gene expression.⁸ Accordingly, CD19, which is a co-receptor of the B-cell receptor and is solely regulated by *PAX5*, becomes lost in a subset of normal BMPCs after *PAX5* down-regulation during B-cell into PC differentiation.^{9,10} After the initial observation that CD19 expression was decreased in mature PCs generated *in vitro*,¹¹ most recent analyses suggested that CD19[–]CD38^{hi}CD138⁺ PCs share similarities with murine long-lived PCs and could represent their human counterpart.^{12,13} Since CD19 expression requires CD81,¹⁴ a tetraspanin widely expressed at all stages of the B-cell lineage,^{4,15} it could be hypothesized that both markers might contribute to identify unique PC subsets during the transition from less- into more-differentiated BMPCs. In such cases, further investigations in MM would be warranted to unravel whether clonal PCs follow a similar pattern of normal PC differentiation according to CD19 – CD81 expression levels, and to determine the clinical sequelae of myeloma PCs' differentiation stage.

Here, we started by showing that the combined expression of CD19 and CD81 identified three unique BMPC subsets in healthy individuals with distinct functional and phenotypic features, consistent with progressively increased differentiation from CD19⁺CD81⁺ into CD19[–]CD81⁺ and CD19[–]CD81[–] normal BMPCs. Subsequently, we demonstrated that

myeloma PCs fit into such a model of normal BMPC differentiation, and that patients with less-differentiated clones had dismal survival. PC differentiation is also related to therapy-induced selective pressure, through which less-differentiated PCs subclones become enriched from diagnosis into minimal residual disease (MRD) stages in a subset of MM patients. Most interestingly, less-differentiated PCs maintain the expression of genes related to preceding B-cell stages, and show different mutation profiles as compared to fully differentiated PC subclones within individual MM patients.

Materials and Methods

Patients, controls and samples

A total of 225 elderly, transplant-ineligible patients with newly diagnosed symptomatic MM staged according to the International Myeloma Working Group criteria¹⁶ were prospectively studied after inclusion in the PETHEMA/GEM2010MAS65 trial (NCT01237249). In all cases, BM aspirates were collected at diagnosis and in 40 out of the 225 patients, also after induction therapy for preplanned MRD monitoring. BM aspirates were additionally taken from 20 healthy individuals (median age: 46 years; range: 19–64 years) to study the functional and phenotypic characteristics of normal PCs. All samples were collected after informed consent was given by each individual, according to the local ethical committees and the Helsinki Declaration.

Multidimensional flow cytometry (MFC) immunophenotyping

Approximately 200 µl of ethylenediaminetetraacetic acid-anticoagulated BM aspirated samples from newly diagnosed MM patients were immunophenotyped using two different eight-colour combinations of monoclonal antibodies (MoAb) and a direct immunofluorescence stain-and-then-lyse technique – (Pacific Blue (PacB)/Pacific Orange (PacO)/fluorescein isothiocyanate (FITC)/phycoerythrin (PE)/peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5)/PE-cyanin 7 (PE-Cy7)/allophycocyanin (APC)/APCH7): (i) CD45/CD138/CD38/CD56/β2microglobulin/CD27/CD19/cyKappa/cyLambda; (ii) CD45/CD138/CD38/CD28/CD27/CD19/CD117/CD81 following the EuroFlow guidelines¹⁷ to identify clonal PCs, and characterize their pattern of expression for CD19 and CD81. Patients with no reactivity for CD19 and < 10% CD81⁺ clonal PCs were classified as CD19⁻CD81⁻, whereas those cases with < 50% CD19⁺ clonal PCs but CD81 expression (> 10%) were classified as CD19⁻CD81⁺; all remaining patients showing ≥ 50% CD19⁺ clonal PCs were classified as CD19⁺CD81⁺ (all of them were positive for CD81). After induction therapy, a single eight-colour MoAb combination (PacB/PacO/FITC/PE/PerCP-Cy5.5/PE-Cy7/APC/APCH7) with CD45/CD138/CD38/CD56/CD27/CD19/CD117/CD81 was used to monitor MRD, and whenever persistent MRD was detected, the percentage of CD19⁺ and/or CD81⁺ clonal PCs was determined to compare, at the individual-patient-level, with that found at diagnosis. The same eight-colour MoAb combination was used to characterize the BMPC compartment of the 20 healthy individuals. In five out of the former 20 cases, an additional eight-colour MoAb combination (BV421/BV510/FITC/PE/PerCP-Cy5.5/PE-Cy7/APC/APCH7) with CD138/CD27/cyIgM+cyIgA/cyIgG/CD38/CD19/cyKappa/CD81 was stained to quantify the cytoplasmic (cy) immunoglobulin (Ig) heavy chain distribution in different PC subsets according to CD19 – CD81 expression. Data acquisition

was performed for approximately 10^6 leukocytes/tube in an FACSCantoII flow cytometer (Becton Dickinson – BD – San Jose, CA, USA) using the FACSDiva 6.1 software (BD). Data analysis was performed using the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain).

Quantitation of replication history

B-lymphocyte precursors, transitional, naive and memory B-cells, CD19⁺ and CD19[−] PCs were FACS-sorted (FACS Aria II, BD; purity 97%) from BM samples of healthy individuals ($n = 5$), according to their respective phenotypic characteristics as described elsewhere.^{18–20} The replication history of B-lymphocytes and PCs was determined using the κ -deleting recombination excision circle assay, which is based on the quantification of coding joints and signal joints of an Ig-deleting rearrangement (intron RSS-Kde) by real-time quantitative PCR.²⁰ Primers and probes were designed to specifically amplify the intronRSS-Kde rearrangements (coding joint) and the corresponding signal joint using TaqMan-based real-time quantitative PCR from DNA isolated from FACS-sorted cell subsets.²⁰ The real-time quantitative PCR mixture of 25 μ l contained TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), 900 nm of each primer, 100 nm of each FAM-TAMRA-labelled probe, 50 ng of DNA and 0.4ng BSA, and was run on the ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems).²⁰

Cell cycle analyses

The proliferation index of different normal PC subsets according to CD19 – CD81 expression was analysed in BM samples from five healthy individuals using five-colour staining for nuclear DNA and four cell surface antigens (CD19–PacB/CD45–PacO/CD38–FITC/CD81–PE) as described elsewhere.²¹

Single-cell multidimensional phenotyping

Bone marrow aspirates from healthy individuals ($n = 10$) were immunophenotyped using four different eight-colour combinations of MoAb: (PacB, PacO, FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, alexafluor 700 (AF700)): (i) CD29, CD45, CD11a, β 7, CD79b, CD49d, CD19, CD38; (ii) CD11c, CD45, CD41a, CD49e, CD33, CD117, CD19, CD38; (iii) CD20, CD45, CD81, CD54, CD138, CD56, CD19, CD38; and (iv) HLA-DR, CD45, CD44, CXCR4, CD27, CD28, CD19, CD38. The expression of all 23 phenotypic markers was analysed at the single PC-level and compared between the CD19⁺CD81⁺, CD19[−]CD81⁺ and CD19[−]CD81[−] subsets, using the merge and calculation functions of the Infinicyt software as described elsewhere.^{22–24}

Fluorescence-in-situ-hybridization (FISH) and deep-targeted sequencing

FISH was performed at diagnosis on immunomagnetic-enriched PCs from 169 out of the 225 cases with available phenotypic data. DNA from two PC clones FACS-purified according to their differentiation status from six newly diagnosed MM patients was analysed including the corresponding germline samples. DNA was extracted from cells using AllPrep DNA/RNA Micro Kit, Qiagen (Hilden, Germany). Targeted gene sequencing was performed using 20 ng of input DNA and applying the MM Mutation Panel Version 2.0 (M3P 2.0). Targeted panel consists of 1271 amplicons from 77 genes commonly mutated in MM.

Enriched templates were sequenced using semiconductor technology (Ion Proton, Life Technologies, Waltham, MA, USA) and analysed with Ion Reporter Software v4.4 (Life Technologies). A median of 1700x depth coverage was obtained. Mutation calls were considered positive when called by $\geq 5\%$ variant reads, with a minimum depth coverage of 10 reads.

Gene expression profiling (GEP)

A total of 71 newly diagnosed MM patients screened at the University of Arkansas for Medical Sciences and with simultaneously available information on CD19 and CD81 immunophenotypic patterns of expression and GEP were included in this analysis. An aliquot of BM aspirate was collected to isolate CD138⁺ PCs with immunomagnetic bead selection (autoMACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), as described elsewhere.²⁵ Purity of PC was monitored by flow cytometry and was $\geq 85\%$. Total RNA was used to measure GEP with Affymetrix U133 Plus 2.0 microarrays. Differentially expressed genes between classes were identified using the Significant Analysis of Microarrays algorithm. Analyses were performed using BRB-ArrayTools (version 4.4.1) developed by Dr Richard Simon and the BRB-ArrayTools Development Team, available at <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>.

DNA methylation studies

We used the EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) for bisulfite conversion of 500 ng genomic DNA. Bisulfite-converted DNA was hybridized onto the HumanMethylation 450 K BeadChip kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Data from the 450 k Human Methylation Array were analysed as described previously.²⁶

Statistical analysis

Correlation studies between PC subset distribution and age were performed using the Pearson test. The Wilcoxon signed rank test was used to evaluate the statistical significance of the percentage of each PC subset in the distinct phases of the cell cycle, as well as for the replication history of each PC subset. Conversely, the Friedman test was used to compare the distribution according to the heavy-chain Ig isotype across the different PC subsets. The Mann–Whitney U and the Kruskal–Wallis tests were used to estimate the statistical significance of differences observed between two or more groups, respectively. Survival was analysed by the Kaplan–Meier method, and differences between curves were tested for statistical significance with the two-sided log-rank test. Progression-free survival (PFS) was defined as the time from diagnosis to disease progression or death from any cause, and overall survival (OS) as time from diagnosis to death from any cause. A multivariate Cox proportional hazard model was developed to explore the independent value of significant variables on the univariate analysis, and variables were retained in the model for levels of significance $P < 0.05$. The SPSS software (version 20.0; IBM, Armonk, NY, USA) was used for all statistical tests.

Results

Combined expression of CD19 and CD81 identifies three unique normal BM PC subsets

We first determined the distribution of the CD19⁺CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets within total BMPCs from healthy individuals; overall, the CD19⁺CD81⁺ subset accounted for the majority of PCs (median of 79% within the BMPC compartment), followed by the CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets (14 and 5%, respectively). However, when we compared the distribution of each subset within the BMPC compartment across different age decades, we noted that while CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ PCs were almost absent among healthy individuals aged 10–20 years, their frequency progressively increased from younger to older individuals (Figure 1a). Accordingly, there was a significant ($P \leq 0.006$) correlation between age and the distribution of the CD19⁺CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets (Figure 1a), suggesting that CD19⁺CD81⁺ normal BMPCs appear earlier in the development of antibody responses, whereas CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ PCs accumulate in the BM later in life. Since during PC differentiation acquisition of secretory capacity is accompanied by progressive cell cycling exit, we subsequently explored the distribution of the CD19⁺CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets within G₀/G₁ and S-phase/G₂M normal BMPCs. As expected, the majority of BM PCs were in G₀/G₁ (data not shown), but while the relative distribution of all three CD19⁺CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets in G₀/G₁ was inside the normal ranges described above, there were virtually no CD19⁻CD81⁻ PCs in S-phase/G₂M (Figure 1b; $P = 0.03$). Thus, CD19⁻CD81⁻ normal PCs were not only enriched in the BM of elderly healthy individuals, but also showed virtually no proliferation, suggesting that among CD19⁻ PCs, those lacking CD81 could be more differentiated than CD19⁻CD81⁺ BMPCs. Additional analysis was performed to assess the replication history of CD19⁺CD81⁺ and total CD19⁻ BMPCs, since it was not possible to purify sufficient cells numbers for the κ -deleting recombination excision circle assay from CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ BMPCs separately (Figure 1c); that notwithstanding, we confirmed that PCs have a superior median number of cell cycles compared to B-lymphocytes ($P = 0.04$), but also showed that within the BMPC compartment, the median number of cell cycles in CD19⁻ PCs was slightly superior to that of CD19⁺ PCs ($P = 0.08$). Additionally, there was a trend ($P = 0.07$) for an altered distribution of Ig heavy-chain isotypes between PC subsets according to their CD19 – CD81 expression, with progressively decreasing frequencies of IgA⁺ PCs counterbalanced with increasing numbers of IgG⁺ PCs along the respective CD19⁺CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ BMPC subsets (Figure 1d). Further phenotypic differences were observed after single-cell analysis of 21 markers within the CD19 – CD81 phenotypic pathway, with decreasing mean fluorescence intensity of CD27, CD38, CD44 and CD54 combined with progressively increased expression of CD28 and CD56 being observed along the CD19⁺CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ BMPC subsets (Figure 1e). Overall, our results indicate that the combined CD19 – CD81 pattern of expression identifies three BMPC subsets with singular functional and phenotypic characteristics, consistent with an accumulation of long-lived, less active and fully differentiated PCs from the CD19⁺CD81⁺ and CD19⁻CD81⁺ into the CD19⁻CD81⁻ BMPC subsets.

Clinical sequelae of the differentiation stage of myeloma PC clones

After demonstrating the existence of three well-defined normal BMPC subsets with distinct differentiation, we sought to determine how myeloma PC clones fit in such a model of normal BMPC differentiation. Upon specific analysis of the CD19 – CD81 pattern of expression in clonal PCs from 225 newly diagnosed MM patients, we found that more than half (132/225; 59%) had clonal PCs that phenotypically matched the fully differentiated normal PC counterpart (that is: CD19⁺CD81⁺); conversely, 86 out of the 225 patients (38%) displayed intermediate-differentiated myeloma PCs (that is: CD19⁺CD81⁺), whereas only seven cases (3%) showed clonal PCs for which the normal counterpart would correspond to the less-differentiated BMPC subset (that is: CD19⁺CD81⁺). Interestingly, patients with less- and intermediately differentiated clonal PCs had a different phenotypic profile vs cases with a fully differentiated PC phenotype (Table 1), with significantly less frequent CD28⁺ and CD117⁺ expression; conversely, CD45 positivity was more frequent among patients with less-differentiated PC clones (Table 1). Furthermore, we noted a trend ($P = 0.07$) for higher frequencies of cytogenetic abnormalities (that is: t(IGH), +1q, del(13q), and/or del(17p)) from patients with less-into intermediate- and fully differentiated PCs (Table 2); in fact, cases with less-differentiated clones only showed +1q, and no *IGH* translocations nor del(13q) nor del(17p). Patients with less- and intermediately differentiated clonal PCs achieved lower MRD-negative rates as compared to cases with a more mature PC phenotype (25 and 20 vs 40%; $P = 0.03$). Upon investigating if the differentiation stage of myeloma PC clones influenced patients' prognosis, we noted that progression-free survival and overall survival of cases in less- and intermediate-differentiation stages was significantly inferior as compared to patients with fully differentiated CD19⁺CD81⁺ myeloma PC clones (Figures 2a and b). The treatment arm had no impact in patients' outcomes according to PC differentiation (data not shown). Multivariate analysis of baseline prognostic factors for survival including the differentiation stage of clonal PCs plus patients' age, ISS and FISH cytogenetics showed that the best combination of independent predictive parameters for progression-free survival and overall survival were PC differentiation and FISH cytogenetics (Table 3). Accordingly, the differentiation stage of clonal PCs continued to be prognostically relevant for progression-free survival and overall survival when the analysis was restricted to cytogenetically defined standard-risk cases (Figures 2c and d), suggesting that the presence of less-differentiated myeloma PC clones identifies a subgroup of patients with more aggressive disease despite standard-risk cytogenetic profiles.

Less-differentiated PC clones may become predominant at the MRD stage

Since the differentiation stage of clonal PCs at baseline was intrinsically related to patients' response to therapy and survival, we subsequently evaluated the *in vivo* chemoresistant profile of different myeloma PC clones according to their differentiation stage, by performing a longitudinal comparison of the CD19 – CD81 pattern of expression in clonal PCs at diagnosis (baseline) vs after treatment during MRD monitoring (the chemoresistant subclone) in 40 MM patients. Overall, we found that while the expression of CD19 remained mostly stable between baseline and MRD (Figure 3a), there was a significant increase in the percentage of CD81⁺ chemoresistant clonal PCs after therapy (mean of 31 vs 21% at baseline, $P = 0.04$). Accordingly, 30/40 (75%) patients displayed the same differentiation stage during baseline and MRD monitoring (16 corresponding to the fully differentiated PC

subset (that is: CD19⁻CD81⁻) and 14 to the intermediate stage (that is: CD19⁻CD81⁺), whereas 10/40 (25%) patients showed clonal selection of PCs with altered differentiation upon therapy-induced selective pressure (Figure 3b). Namely, eight cases with fully differentiated phenotypes at diagnosis showed intermediate stage chemoresistant clonal PCs after therapy; conversely, the remaining two patients transitioned from a CD19⁻CD81⁺ into a CD19⁻CD81⁻ phenotype (Figure 3b). These results demonstrate that in approximately one-fourth of MM patients there might be clonal selection upon therapy of PC subsets with a distinct differentiation stage to that observed in the majority of myeloma PCs at diagnosis; such clonal dynamics usually favour less-differentiated PC subclones.

Mutation profiles of intraclonal heterogeneity according to PC differentiation

Upon observing that in selected patients less-differentiated PC subclones became predominant under therapeutic pressure, we decided to investigate whether less- and fully differentiated PC subclones could eventually display different genomic profiles. In order to address this hypothesis, we investigated the presence of mutations in PC subclones sorted according to their differentiation stage within individual patients ($n = 6$), by using a comprehensive panel covering 77 genes. While one case had no detectable mutations among those tested in any of the FACS-purified CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ PC subsets (#1; Figure 4a), the five remaining patients had detectable mutations and their pattern differed within PC subclones sorted according to their differentiation stage. Namely, in case#2 CD19⁻CD81⁺ myeloma PCs displayed mutations in *SP140* that were not present among more differentiated CD19⁻CD81⁻ PCs. Similarly, patient#3 had a mutation in epidermal growth factor receptor among less-differentiated tumour cells while absent in intermediate- and fully differentiated clones. Patient#4 showed a mutation in *DIS3* that was simultaneously present in CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ myeloma PCs; however, intermediate-differentiated cells had an additional mutation in *IKZF3*. Cases #5 and #6 showed the highest differences between the mutation profiles, with mutually exclusive mutations among intermediate- vs fully differentiated myeloma in both cases. Overall, these results suggest that tumour heterogeneity, dissected according to PC differentiation on phenotypic grounds, may uncover the presence of subclones with different mutation profiles.

GEP of MM patients according to the differentiation stage of myeloma PC clones

After demonstrating that myeloma PCs followed the same model of differentiation as observed in BMPCs from healthy individuals, and that such a model had a clear implication in patients' survival, we decided to investigate if the differentiation stage of myeloma PC clones would underlie different mRNA expression. Our results showed that newly diagnosed MM patients with less-differentiated clonal PCs (that is: CD19⁺CD81⁺; $n = 8$) displayed 39 deregulated genes as compared to cases with intermediate-differentiation (that is: CD19⁻CD81⁺; $n = 33$) (Supplementary Excel File 1). *CD19* mRNA expression was consistent with that observed on phenotypic grounds and was down-regulated among CD19⁻CD81⁺ patients; most-interestingly, down-regulation of other B-cell related genes such as *CD79A*, *MS4A1* (*CD20*) and *PAX5* was also observed. *PTPRCAP*, which stabilizes the expression of CD45, the pre-B-lymphocyte 3 protein coding gene *VPREB3*, *TNFSF8* and *CCND1* were also found to be down-regulated among CD19⁻CD81⁺ patients. Although no significantly deregulated genes were observed upon comparing patients with

CD19⁺CD81⁺ vs CD19⁺CD81⁻ ($n = 28$) phenotypes, gene set enrichment analysis showed that patients with intermediate-differentiated CD19⁺CD81⁺ PCs had significantly up-regulation of cell cycle, nucleotide excision repair and DNA replication pathways as compared to those with fully differentiated CD19⁺CD81⁻ PCs, which is consistent with the higher proliferative potential of the former PC subset. Conversely, patients with fully differentiated PCs showed down-regulation of pathways related to protein processing in ER, among others (Supplementary Excel File 2). The comparison between patients with less- vs fully differentiated (that is: CD19⁺CD81⁺ vs CD19⁺CD81⁻) PCs showed up-regulation of *FCRLB*, *MS4A1* (*CD20*), *CTGF*, *BEND5* and *CD81* in less-differentiated clones (Supplementary Excel File 1). Overall, these results confirm a correlation between the phenotype and the GEP of PCs, but also that phenotypically less-differentiated CD19⁺CD81⁺ myeloma clones retain higher expression of genes associated with preceding B-cell stages.

Discussion

In other hematological malignancies such as acute myeloid leukemia, it is current practice to classify blasts according to their differentiation stage, and the concept of cellular plasticity with more immature clones being typically enriched at the MRD and relapse stages has been recognized.²⁷ In MM, it has recently been suggested that a progenitor organization exists within clonal PCs that recapitulates maturation stages between B-cells and PCs, and may contribute to *in vitro* chemoresistance.²⁸ However, there is no accurate knowledge on the myeloma PC differentiation pathway, nor how these correlate with patients' clinical behaviour; in fact, information on the correct identification of less- vs fully differentiated normal BMPCs is yet very limited.^{12,13} Here, we showed the existence of three well-defined maturation stages in both normal and clonal BMPCs identified through the CD19 – CD81 expression axis, and that MM patients harbouring less-differentiated PCs have dismal survival. We also showed that the level of PC differentiation in MM could be related, at least in part, to different chemoresistant potential together with different molecular and genomic profiles.

The variable half-life of different serum antibodies (for example: in response to measles and mumps vs influenza viruses)²⁹ is consistent with specific survival patterns among unique PC subsets, with long-lived PCs being responsible for maintaining such antibody titres for a life-span of several years or decades.³⁰ Two recent studies have characterized CD19⁺ normal PCs and concluded that these are specifically enriched in the BM and display unique morphological, transcriptomic and phenotypic features consistent with increased differentiation as compared to CD19⁺ PCs;^{12,13} accordingly, affinity for viral antigens to which healthy individuals had not been exposed for more than 40 years have been exclusively detected among CD19⁺ BMPCs.¹² Such observations open new research areas to further investigate the features of specific normal and pathological PC subsets according to their differentiation.¹² Thus, reinforced by the recent confirmation³¹ of the regulatory role of CD81 over CD19 within the B-cell co-receptor,^{14,32–34} we decided to investigate if the CD19 – CD81 pattern of expression could help to further dissect unique PC differentiation subsets. Our results are consistent with those reported by Halliley *et al.*¹² and Mei *et al.*¹³ and show that in healthy individuals, CD19⁺ BMPCs are less proliferative and

are enriched in IgG secreting cells, as compared to the CD19⁺ subset. The notion that CD19⁻ BMPCs are more differentiated than the positive subset was further confirmed in our study after demonstrating that the former have higher replication history. However, we also showed that CD19⁻ BMPCs can be further dissected into CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets, and that the latter represent the most differentiated compartment among total BMPCs.

Longevity of PCs in BM is restricted by competition for niche space³⁵ and in this competitive model, PC intrinsic features likely contribute to determine their life span by controlling PC function and niche affinity.¹¹ Here, CD28 and CD56 expression was found to be progressively increased from less- CD19⁺CD81⁺ into more-differentiated CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ BMPCs; accordingly, long-term humoral immunity has been reported to depend on the PC-intrinsic function of CD28 signalling down-stream of the CD28 Vav motif that regulates BLIMP1.³⁶ CD56 is likely contributing to stronger PC adhesion to BM stromal niches. Most interestingly, pathological PCs in MM displayed a similar phenotypic behaviour as compared to normal PCs, and patients with fully differentiated clones also showed higher expression of CD28 and CD56, as well as CD38^{low}. The fact that mature CD19⁻CD81⁻ normal BMPCs are absent in infants aged 5–7 months¹³ but progressively accumulate later in life as shown here, is also a remarkable coincidence with the fact that monoclonal gammopathy of undetermined significance and MM typically develop in the elderly, and that more than half of the patients (59%) display PC clones that phenotypically overlap with fully differentiated normal PCs. Since loss of CD19 and CD81 expression was observed in both normal and tumour PC differentiation, we hypothesized that their regulation was under epigenetic grounds. Thus, we analysed DNA methylation levels around the CD81 gene (in its upstream CpG island shore region, CpG island, gene body region close to CpG island (Gene Body 1) and the rest of gene body (Gene Body 2)) in three MM cell lines with variable levels of CD81 expression (Figure 5). While no differences in DNA methylation in the CpG island shore and Gene Body 2 regions were observed, the methylation levels in the CpG island and Gene Body region 1 showed a clear correlation with CD81 expression, suggesting that these regions contain regulatory elements that control CD81 expression. Accordingly, methylation in the CpG island and CD81 expression were inversely correlated. In contrast, levels of DNA methylation in the Gene Body region 1 were positively correlated with gene expression. This dual pattern of negative and positive association between gene expression and DNA methylation depending on the region analysed has been previously observed,³⁷ and underlines that the function of DNA methylation is genomic context dependent.³⁸

The notion that PCs represent the terminally differentiated end-stage of the B-cell lineage has likely contributed to a deficiency in knowledge about the levels of phenotypic plasticity and maturation of clonal PCs in MM.^{28,39} Here, we show that up to 41% of MM patients display at diagnosis PC clones corresponding to less-differentiated normal PC counterparts, including 3% corresponding to the more immature CD19⁺CD81⁺ subset. Most interestingly, the latter maintain high expression of genes typically related to mature B-cell stages such as *PAX5*, *CD20*, *CD79b*, *VPREB3*, *TNFSF8* and *CCND1* as revealed by comparing their GEP against that of PCs obtained from patients with intermediate- (CD19⁻CD81⁺) and fully differentiated phenotypes (CD19⁻CD81⁻). These results suggest that the proposed

phenotypic differentiation model of myeloma PCs is corroborated at the molecular level, similarly to what has been recently shown in normal BMPCs from healthy individuals.¹² Importantly, MM patients harbouring less-differentiated PC clones had dismal outcome with a median survival of approximately 1 year. Accordingly, the differentiation status of clonal PCs emerges as a new and independent prognostic marker in MM, complementary to patients' cytogenetic profile. In fact, patients' characterization according to PC differentiation status allowed the identification of a subset of cases with dismal survival albeit standard-risk cytogenetics. It should be noted that the small number of cases harbouring less-differentiated PC clones limits the robustness of the statistical comparison between groups (particularly regarding survival analyses), and these results should be reproduced in larger series of patients (for example: GEM2005MENOS65 and GEM2005MAS65 clinical trials; Supplementary Figure 1). That notwithstanding, the availability of multiple novel and effective drugs combined with the advent of high-throughput (cellular and molecular) techniques, may help to identify small patient subgroups with a unique biology that could benefit from tailored treatment (for example: anti-CD19 CAR T-cells⁴⁰ for cases with less-differentiated myeloma PCs).

The identification of more immature cancer (stem) cells has been historically pursued to justify unexplainable relapses, particularly among patients achieving CR.^{41,42} However, relapses among MM patients in CR are now better understood and predicted with the advent of MRD monitoring, which have shown an intrinsic correlation between the persistence of residual clonal PCs after therapy (that is: MRD) and inferior survival.^{43–46} Here, we used a novel approach to understand ultra-chemoresistance by performing in individual patients longitudinal comparisons between clonal diversity according to PC differentiation at diagnosis vs MRD.²² Hence, we showed that therapeutic pressure may lead to *in vivo* selection of specific PC subsets, and that in approximately one-fourth of MM patients such clonal selection favoured less-differentiated PC subclones. Thus, further studies are warranted to establish a clear relationship between the extent of PC differentiation and their chemoresistant potential. On a different note, these results may also reflect previously unknown levels of cellular plasticity *in vivo*,⁴⁷ by which PCs can transition from mature into more immature stages (and vice-versa) upon therapeutic pressure. The observations that CD81 expression is epigenetically regulated together with the lack of a clear pattern of accumulating mutations in FACS-purified immature vs mature PCs subclones from individual patients, would support such phenomenon of cellular plasticity. Thus, establishing the temporal acquisition of mutations and genetic abnormalities in less- vs more-differentiated PC clones should be investigated in future studies. Interestingly, these findings also unravel that detailed characterization of the MRD PC compartment might be as informative as more conventional MRD quantitation to predict patients' outcome (for example: survival of an MRD-positive patient displaying immature PC clones may be poorer than other MRD-positive cases).^{23,48}

In summary, we shed new light into normal and tumour PC plasticity, with the identification of three well-defined differentiation subsets in both healthy individuals and MM patients, respectively. The demonstration that tumour PC differentiation might be related to unique chemoresistant, molecular and mutation profiles highlights its importance in the prognostication and monitoring of MM patients.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgements

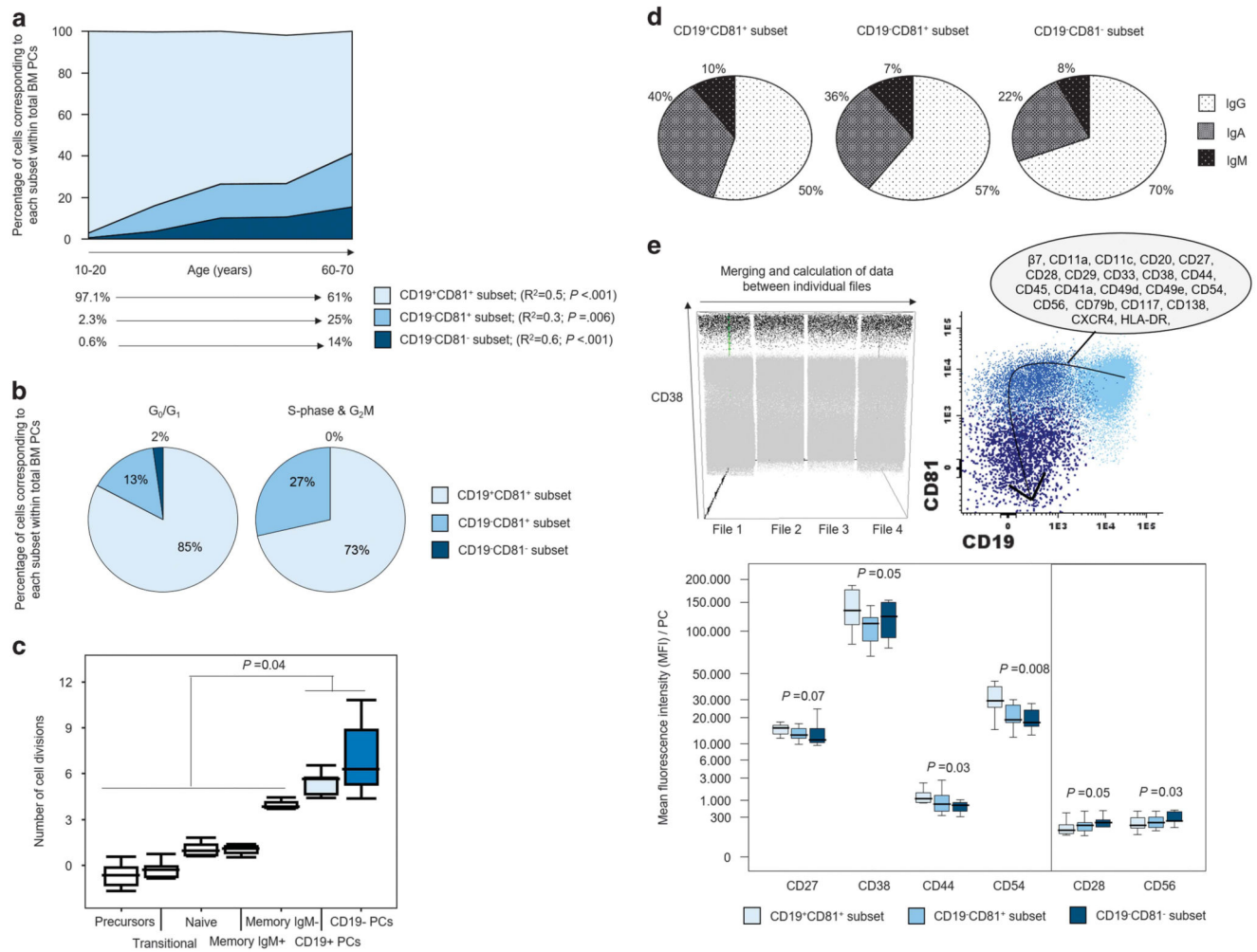
The authors acknowledge all the participants of the Spanish Myeloma Group. This study was supported by the Cooperative Research Thematic Network grants RD12/0036/0048, RD12/0036/0058, RD12/0036/0046, RD12/0036/0068, RD12/0036/0069, and RD12/0036/0061 of the Red de Cancer (Cancer Network of Excellence); Instituto de Salud Carlos III, Spain, Instituto de Salud Carlos III/Subdirección General de Investigación Sanitaria (FIS: PI060339; 06/1354; 02/0905; 01/0089/01-02; PS09-/01897/01370; PI13/01469, PI14/01867, G03/136; Sara Borrell: CD13/00340 and CD12/00540); Fundació La Marató de TV3 (20132130-31-32) and Asociación Española Contra el Cáncer (GCB120981SAN). The study was also supported internationally by the International Myeloma Foundation (IMF) Junior Grant, the Black Swan Research Initiative of the IMF, the Multiple Myeloma Research Foundation research fellow award, the Qatar National Research Fund (QNRF) Award No. 7-916-3-237, Marie Curie (LincMHeM-330598), the AACR-Millennium Fellowship in Multiple Myeloma Research (15-40-38-PAIV), Leukemia Research Foundation and the European Research Council (ERC) 2015 Starting Grant.

References

1. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*. 2011; 117:4701–4705. [PubMed: 21292778]
2. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Perez JJ, Bottcher S, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015; 90:61–72. [PubMed: 26100534]
3. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutierrez N, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol*. 2008; 26:2737–2744. [PubMed: 18443352]
4. Paiva B, Gutierrez NC, Chen X, Vidriales MB, Montalban MA, Rosinol L, et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2012; 26:1862–1869. [PubMed: 22333880]
5. Bataille R, Jigo G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of 'many and multiple myelomas' and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006; 91:1234–1240. [PubMed: 16956823]
6. Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, Mateo G, Lopez A, Rasillo A, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78:239–252. [PubMed: 20155853]
7. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008; 93:431–438. [PubMed: 18268286]
8. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:230–242. [PubMed: 15738953]
9. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*. 2007; 8:463–470. [PubMed: 17440452]
10. Kozmik Z, Wang S, Dorfler P, Adams B, Busslinger M. The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol*. 1992; 12:2662–2672. [PubMed: 1375324]
11. Cocco M, Stephenson S, Care MA, Newton D, Barnes NA, Davison A, et al. In vitro generation of long-lived human plasma cells. *J Immunol*. 2012; 189:5773–5785. [PubMed: 23162129]
12. Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, Rosenberg AF, Darce J, Gregoretti IV, et al. Long-lived plasma cells are contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) subset in human bone marrow. *Immunity*. 2015; 43:132–145. [PubMed: 26187412]

13. Mei HE, Wirries I, Frolich D, Brisslert M, Giesecke C, Grun JR, et al. A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow. *Blood*. 2015; 125:1739–1748. [PubMed: 25573986]
14. van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandene L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest*. 2010; 120:1265–1274. [PubMed: 20237408]
15. Barrena S, Almeida J, Yunta M, Lopez A, Fernandez-Mosteirin N, Giral M, et al. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia*. 2005; 19:1376–1383. [PubMed: 15931266]
16. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006; 20:1467–1473. [PubMed: 16855634]
17. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26:1908–1975. [PubMed: 22552007]
18. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78(Suppl 1):S47–S60. [PubMed: 20839338]
19. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood*. 2011; 118:2150–2158. [PubMed: 21690558]
20. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJ. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med*. 2007; 204:645–655. [PubMed: 17312005]
21. Paiva B, Paino T, Sayagues JM, Garayoa M, San-Segundo L, Martin M, et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*. 2013; 122:3591–3598. [PubMed: 24072855]
22. Paiva B, Corchete LA, Vidriales MB, Puig N, Maiso P, Rodriguez I, et al. Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood*. 2016; 127:1896–1906. [PubMed: 26755711]
23. Paino T, Paiva B, Sayagues JM, Mota I, Carvalheiro T, Corchete LA, et al. Phenotypic identification of subclones in multiple myeloma with different chemoresistant, cytogenetic and clonogenic potential. *Leukemia*. 2015; 29:1186–1194. [PubMed: 25388955]
24. Paiva B, Corchete LA, Vidriales MB, Garcia-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2015; 125:2370–2380. [PubMed: 25655603]
25. Usmani SZ, Crowley J, Hoering A, Mitchell A, Waheed S, Nair B, et al. Improvement in long-term outcomes with successive Total Therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? *Leukemia*. 2013; 27:226–232. [PubMed: 22705990]
26. Agirre X, Castellano G, Pascual M, Heath S, Kulis M, Segura V, et al. Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Res*. 2015; 25:478–487. [PubMed: 25644835]
27. Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a ‘moving target’ for detection of residual disease. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014; 86:3–14. [PubMed: 24151248]
28. Leung-Hageteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, et al. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2013; 24:289–304. [PubMed: 24029229]
29. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med*. 2007; 357:1903–1915. [PubMed: 17989383]
30. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997; 388:133–134. [PubMed: 9217150]

31. Vences-Catalan F, Kuo CC, Sagi Y, Chen H, Kela-Madar N, van Zelm MC, et al. A mutation in the human tetraspanin CD81 gene is expressed as a truncated protein but does not enable CD19 maturation and cell surface expression. *J Clin Immunol.* 2015; 35:254–263. [PubMed: 25739915]
32. Cherukuri A, Carter RH, Brooks S, Bornmann W, Finn R, Dowd CS, et al. B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J Biol Chem.* 2004; 279:31973–31982. [PubMed: 15161911]
33. Cherukuri A, Shoham T, Sohn HW, Levy S, Brooks S, Carter R, et al. The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol.* 2004; 172:370–380. [PubMed: 14688345]
34. Shoham T, Rajapaksa R, Boucheix C, Rubinstein E, Poe JC, Tedder TF, et al. The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Immunol.* 2003; 171:4062–4072. [PubMed: 14530327]
35. Tokoyoda K, Hauser AE, Nakayama T, Radbruch A. Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:193–200. [PubMed: 20154734]
36. Rozanski CH, Utley A, Carlson LM, Farren MR, Murray M, Russell LM, et al. CD28 promotes plasma cell survival, sustained antibody responses, and BLIMP-1 upregulation through its distal PYAP proline motif. *J Immunol.* 2015; 194:4717–4728. [PubMed: 25833397]
37. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012; 44:1236–1242. [PubMed: 23064414]
38. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012; 13:484–492. [PubMed: 22641018]
39. Chaidos A, Barnes CP, Cowan G, May PC, Melo V, Hatjiharissi E, et al. Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma. *Blood.* 2013; 121:318–328. [PubMed: 23169779]
40. Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells against CD19 for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015; 373:1040–1047. [PubMed: 26352815]
41. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood.* 2004; 103:2332–2336. [PubMed: 14630803]
42. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:4048–4053. [PubMed: 17360475]
43. Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martinez J, Paiva B, Garcia H, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Blood.* 2014; 123:391–397.
44. Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, Vidriales MB, Montalban MA, Martinez-Lopez J, et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood.* 2012; 119:687–691. [PubMed: 22128143]
45. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, Gonzalez M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood.* 2014; 123:3073–3079. [PubMed: 24646471]
46. Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, Davies FE, Bell SE, Drayson MT, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood.* 2015; 125:1932–1935. [PubMed: 25645353]
47. Yaccoby S. The phenotypic plasticity of myeloma plasma cells as expressed by dedifferentiation into an immature, resilient, and apoptosis-resistant phenotype. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:7599–7606. [PubMed: 16278377]
48. Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood.* 2015; 125:3059–3068. [PubMed: 25838346]

**Figure 1.**

Bone marrow (BM) normal plasma cell (PC) subsets according to the CD19 – CD81 expression axis. **(a)** Age-related changes in the distribution of BM normal PC subsets. The percentage of the CD19⁺CD81⁺, CD19⁺CD81⁺ and CD19⁺CD81⁺ subsets within total BM PCs from each healthy donor ($n = 20$) was determined, and median values per subset for each age decade are represented by light, intermediate and dark blue areas, respectively. Linear regression between individuals' age and the respective percentage for each PC subset is also shown. **(b)** Proliferative potential of the different BM normal PC subsets. The percentage of the CD19⁺CD81⁺ (light blue), CD19⁺CD81⁺ (intermediate blue) and CD19⁺CD81⁺ (dark blue) subsets within total BM PCs from healthy donor ($n = 5$) in G₀/G₁ and S-phase/G₂M phases of the cell cycle is shown. **(c)** Quantification of the replication history of progressively maturing BM B cell and PC subsets from healthy individuals using κ -deleting recombination excision circles. The line in the middle and vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively, for the CT between the coding joint and the signal joint in FACS-sorted B-cell precursors, transitional, naïve and memory B-cells, CD19⁺ and CD19⁺ PCs from BM samples of healthy individuals ($n = 5$). **(d)** Immunoglobulin (Ig) heavy chain isotype distribution of the

different BM normal PC subsets. After PC identification according to their bright CD38 and CD138 expression and unique scatter characteristics, cyIgG⁺ PCs were defined as those showing reactivity in the PE channel (cyIgA+cyIgG) but not in the FITC channel (cyIgM+cyIgA), whereas cyIgA⁺ PCs were defined as those showing (diagonal) double-staining in the FITC+PE channels; cyIgM⁺ PCs were defined by reactivity in the FITC channel but not in PE. The percentage of cytoplasmic IgG, IgA and IgM is shown within the respective CD19⁺ CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets. (e) Immunophenotypic protein expression profiles of the different BM normal PC subsets. Due to the existence of five parameters measured in common for each aliquot (CD38, CD45, CD19, forward light scatter – FSC and sideward light scatter – SSC), it was possible to define the PC compartment in each aliquot and fuse the different data files corresponding to the four different eight-colour MoAb combinations studied per sample into a single data file containing all information measured for that sample, using the merge function of the Infinicyt software. For any single PC in each eight-colour MoAb combination, this included data about those antigens that were measured directly on it and antigens that were not evaluated directly ('missing values') for that cell in the corresponding tube it was contained in. Then, the calculation function of the Infinicyt software was used to fill in the 'missing values', based on the 'nearest neighbour' statistical principle, defined by the unique position of individual PCs the multidimensional space created by the five common (backbone) parameters (FSC, SSC, CD38, CD45 and CD19). Ultimately, the expression of all 23 phenotypic markers could be analysed at the single PC level, and compared between PCs clustering into the specific CD19⁺CD81⁺, CD19⁻CD81⁺ and CD19⁻CD81⁻ subsets. Markers differentially expressed between the CD19⁺CD81⁺ (light blue), CD19⁻CD81⁺ (intermediate blue) and CD19⁻CD81⁻ (dark blue) subsets within BM normal PCs from healthy individuals ($n = 10$). Notched boxes represent the 25th and 75th percentile values of the amounts of antigen mean fluorescence intensity expression per BM PCs; the line in the middle and vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively.

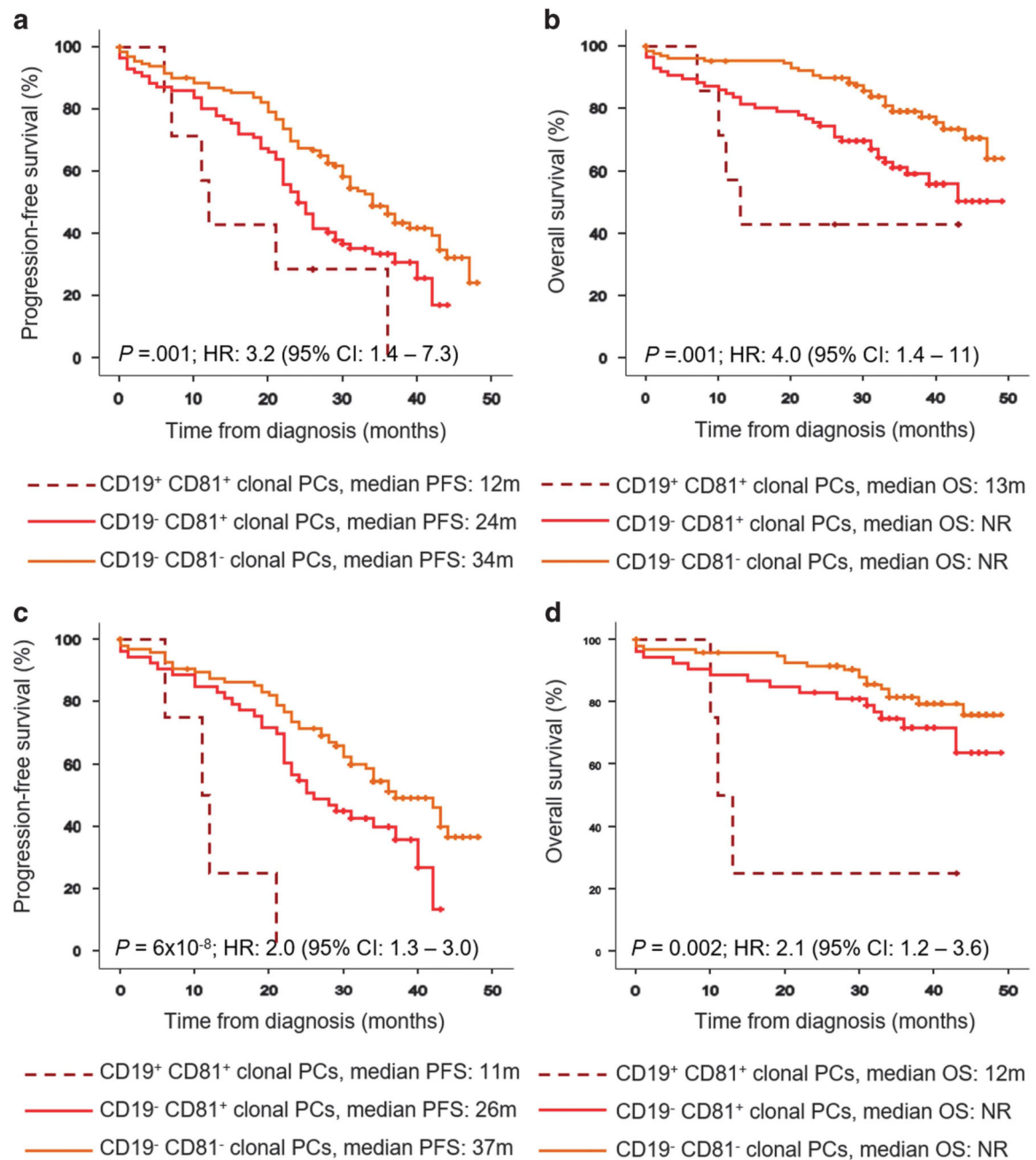


Figure 2.

Multiple myeloma (MM) patients' survival according to the differentiation stage of myeloma PC clones. Panels **a** and **b** show progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) for the overall series of MM patients ($n = 225$) grouped according to the differentiation stage of clonal plasma cells (PCs) at diagnosis: more-differentiated (CD19⁻CD81⁻), intermediate-differentiated (CD19⁻CD81⁺) and less-differentiated (CD19⁺CD81⁺). Patients' treatment consisted of either nine identical induction cycles with bortezomib, melphalan, prednisone (VMP) followed by other nine cycles of lenalidomide

plus low-dose dexamethasone (Rd; $n = 112$), or alternating cycles of VMP and Rd for up to 18 courses ($n = 113$). The median follow-up of the series was 3 years. Panels **c** and **d** show PFS and OS in patients with standard-risk cytogenetics ($n = 154$; all those cases without t(4;14), t(14;16) and/or del(17p13)).



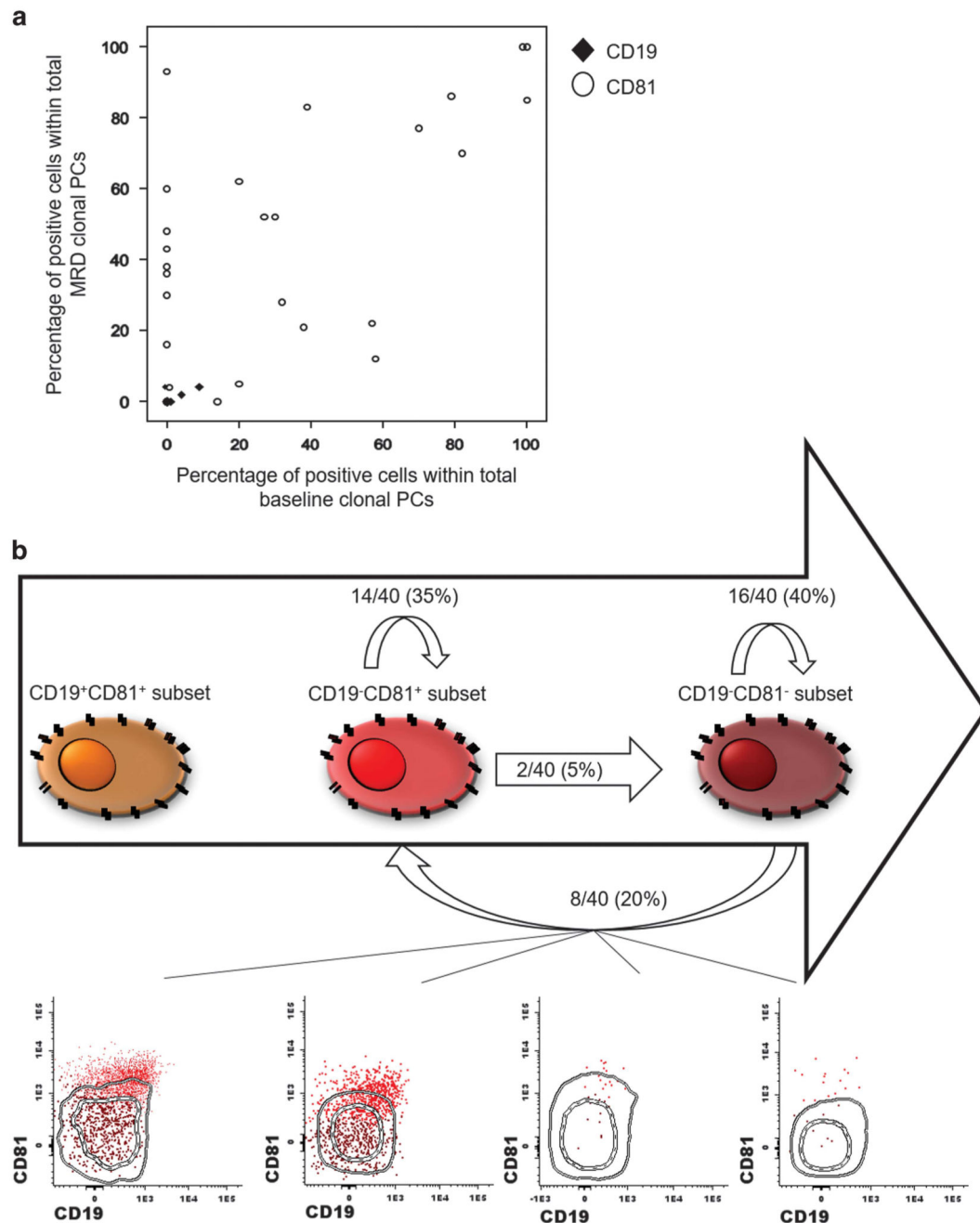


Figure 3.

Therapeutic selection at the MRD stage of myeloma PC subclones defined according to their differentiation stage. **(a)** Correlation between the percentage of CD19 (black squares) and CD81 (open circles) positive plasma cells (PCs) within total baseline (x axis) vs MRD (y axis) clonal PCs in longitudinal bone marrow samples from 40 multiple myeloma (MM) patients analysed at diagnosis and after therapy. **(b)** Schema showing the frequency of patients following specific clonal dynamics according to the differentiation stage of myeloma PCs from diagnosis to the MRD stage. Representative bivariate dot plot

histograms illustrating the patterns of CD19 vs CD81 expression in clonal PCs at diagnostic (represented by lines corresponding to one and two SD) and at the MRD stage (red dots) corresponding to four out of the eight patients that evolved from baseline more differentiated (that is: CD19⁺CD81⁺) into intermediate-differentiated (that is: CD19⁺CD81⁻) chemoresistant PC clones after therapy, ordered from left to right, denoting high to low MRD levels, are also shown. Twelve out of the 30 patients displaying the same differentiation stage during baseline and MRD monitoring attained CR, three out of the eight cases with fully differentiated phenotypes at diagnosis showing intermediate stage chemoresistant clonal PCs after therapy attained CR, and so did one out of the two patients transitioned from a CD19⁺CD81⁺ into a CD19⁺CD81⁻ phenotype.

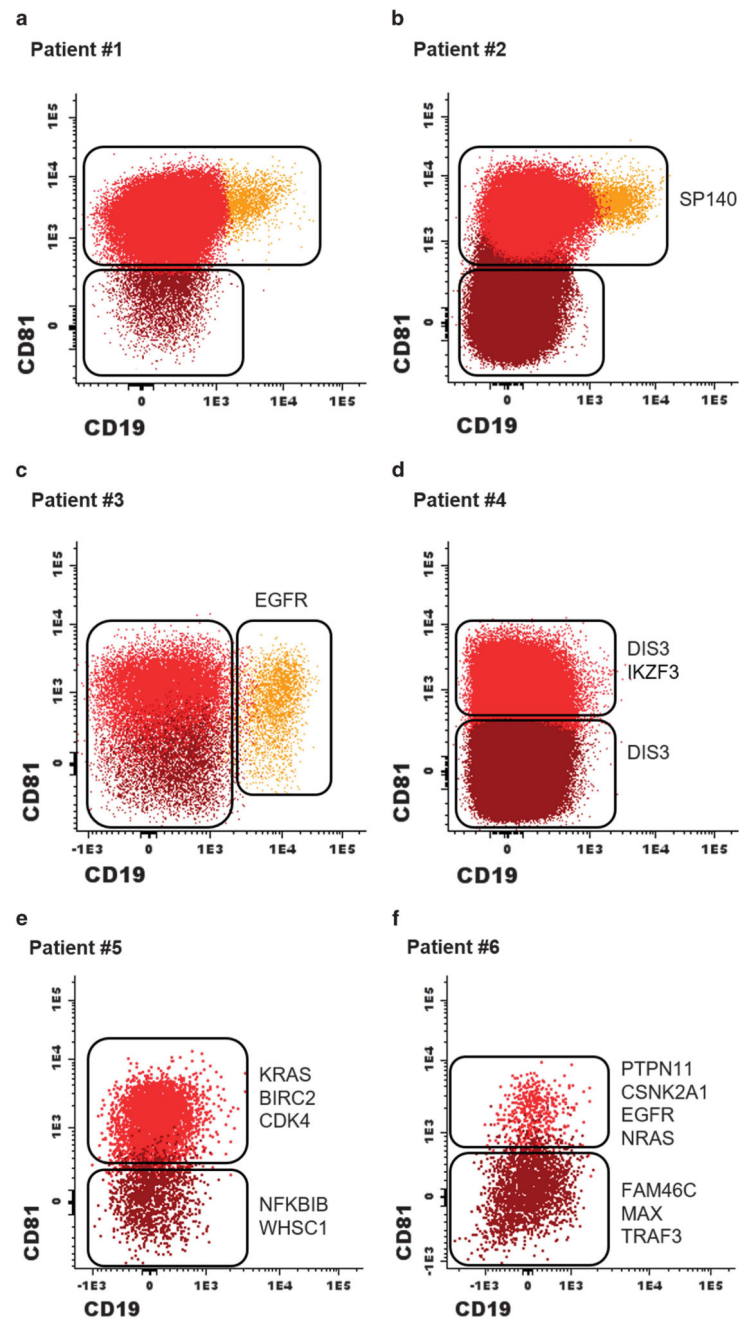


Figure 4.

Distinct PC differentiation subsets within individual patients show different mutation profiles. Clonal plasma cells (PCs) corresponding to the intermediate- (CD19⁺CD81⁺) and more-differentiated (CD19⁺CD81⁻) subsets were FACS-sorted from patients #1, #2, #4, #5 and #6 (**a**, **b**, **d**, **e** and **f**) for mutation analysis using a targeted-sequencing panel covering 77 genes; in patient #3 (**c**), mutations were investigated in less-differentiated (CD19⁺CD81⁺) vs intermediate- (CD19⁺CD81⁺) and more-differentiated (CD19⁺CD81⁻) PC clones.

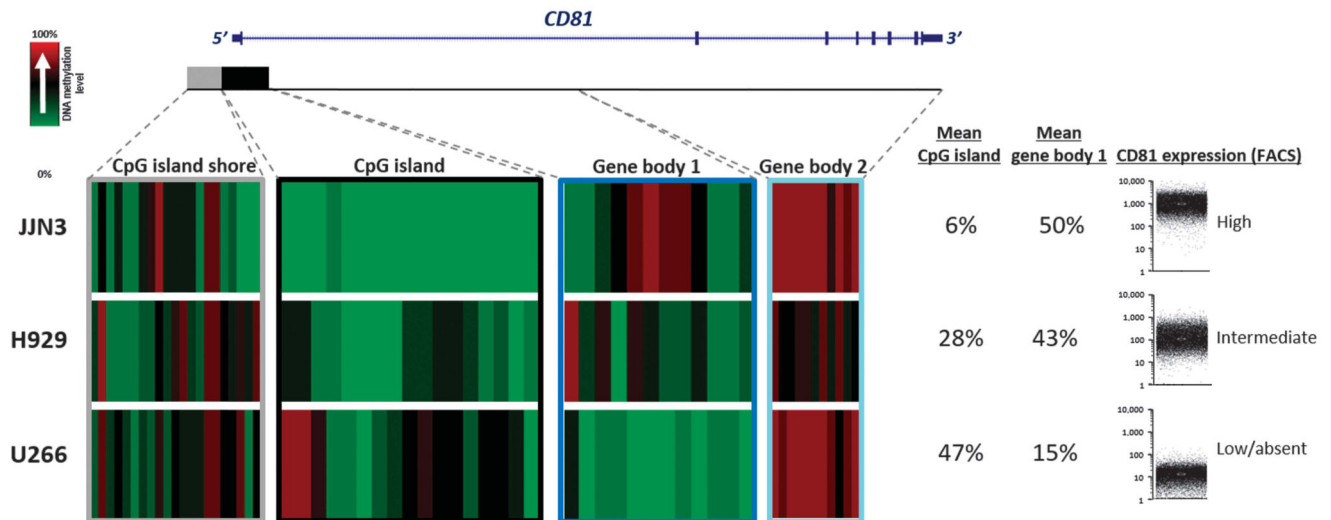


Figure 5.

The sequential CpGs measured by HumanMethylation450 BeadChip for the *CD81* gene. We investigated the expression levels of CD19 and CD81 in a large panel of MM cell lines (RPMI-8226, RPMI-LR5, NCI-H929, OPM-2, JJN3, MM1S, MM1R, MM144, U266, U266-DOX4, U266-LR7, SJR and MGG) and identified five cell lines positive for CD81 (RPMI-8226, RPMI-LR5, NCI-H929, OPM-2, JJN3) in the absence of CD19; all the others exhibited no expression for both CD19 and CD81 (data not shown). Afterward, under the hypothesis that loss of CD81 expression could be due to epigenetic regulation of the *CD81* gene, we investigated the DNA methylation profile of *CD81* in the NCI-H929, JJN3 and U266 cell lines (the first two positive for CD81 and the third negative). Accordingly, we observed an inverse correlation between DNA methylation levels in the CpG island region of the *CD81* gene and the protein (antigen) expression level of CD81 in the three MM cell lines. Interestingly, the DNA methylation levels in the CpG island region were also inversely correlated with the DNA methylation levels in the gene body region of *CD81*. These results indicate that an epigenetic mechanism of DNA methylation plays an important role in the regulation of CD81 expression. The mean of the DNA methylation levels of the CpGs located in the CpG island or gene body region of *CD81* are also shown.

Table 1

Phenotypic features of patients with less-differentiated (that is, CD19⁺CD81⁺), intermediate-differentiated (that is: CD19-CD81⁺) vs more-differentiated (that is, CD19-CD81⁻) plasma cell clones among newly diagnosed multiple myeloma patients ($n = 225$)

% of cases within subgroup	CD19 ⁺ CD81 ⁺ (%)	CD19-CD81 ⁺ (%)	CD19-CD81 ⁻ (%)	<i>P</i> -value
CD38 ^{low}	67	52	67	0.09
CD138 ^{low}	33	31	31	0.99
CD27 ⁺	33	43	50	0.48
CD28 ⁺	17	20	35	0.04
CD45 ⁺	67	50	29	0.003
CD56 ⁺	77	76	75	0.85
CD117 ⁺	67	24	41	0.009

Table 2

Cytogenetic characteristics of patients with less-differentiated (that is: CD19⁺CD81⁺) and intermediate-differentiated (that is: CD19-CD81⁺) vs more-differentiated (that is: CD19-CD81⁻) plasma cell clones among newly diagnosed multiple myeloma patients ($n = 169$)

Genetic abnormality	PCs differentiation subset			P-value
	CD19 ⁺ CD81 ⁺ (%)	CD19-CD81 ⁺ (%)	CD19-CD81 ⁻ (%)	
Any	25	62	72	0.07
t(4;14)	0	24	17	NS
t(11;14)	0	68	36	0.03
t(14;16)	0	0	11	NS
+1q	25	41	54	NS
del(13q)	0	49	51	NS
del(17p)	0	13	8	NS
High-risk FISH	0	23	19	NS

Abbreviation: NS, not significant.

Table 3

Multivariate analyses including baseline disease features with univariate significant effect on PFS and/or OS of newly diagnosed elderly myeloma patients included in the GEM2010MAS65 trial

	PFS		OS	
	HR	P	HR	P
Age (< 75 vs ≥ 75 years)	1.3	0.21	2.7	0.001
ISS	1.2	0.50	1.9	0.16
Interphase FISH cytogenetics (standard- vs high-risk)	1.9	0.003	2.7	0.001
PC differentiation stage	1.7	0.005	2.1	0.006

Abbreviations: FISH, Fluorescence-in situ-hybridization; High-risk FISH, t(4;14), t(14;16) and/or del(17p13); ISS, International Staging System; OS, overall survival; PC, plasma cell; PFS, progression-free survival.

Anexo 2

Tabla suplementaria 1 (1/5): 168 mutaciones detectadas en los 79 pacientes de mieloma múltiple de nuevo diagnóstico.

ID	GENE	FUNC	TYPE	LOC	PTEIN	COV	V_COV	VRF (%)	GERM	SIFT	POLYPHEN	COSMIC	dbSNP
2	IDH2	UTR 3'	G/A	UTR 3'	_	1692	823	49%	yes	_	_		
3	NRAS	missense	G/T	exonic	Q61K	91	45	49%	yes	deleterious	benign	1	1
7	ATM	missense	T/C	exonic	L1444P	436	47	11%		deleterious	probably_damaging		
7	DIC3	missense	A/G	exonic	F775L	1898	212	11%		deleterious	probably_damaging		
9	NRAS	missense	C/G	exonic	G12A	2759	383	14%	yes	deleterious	benign	1	1
10	DIC3	missense	C/G	exonic	R780T	220	86	39%		deleterious	probably_damaging	1	
11	NRAS	missense	T/C	exonic	Q61R	509	132	26%		tolerated	benign	1	1
11	ACTG1	missense	C/T	exonic	E3K	720	162	23%		tolerated	benign		
13	ACTG1	missense	A/G	exonic	V35A	363	117	32%		deleterious	probably_damaging		
13	IRF4	missense	C/T	exonic	A341V	658	311	47%		deleterious	probably_damaging	1	
13	KRAS	missense	T/G	exonic	Q61H	935	370	40%		deleterious	benign	1	1
13	CUL4A	missense	G/A	exonic	E546K	1045	432	41%		deleterious	benign		
16	CYLD	missense	T/A	exonic	F352I	433	21	5%		deleterious	benign		
16	TLR4	missense	G/A	exonic	C281Y	116	57	49%		deleterious	probably_damaging	1	
16	ATM	missense	C/T	exonic	S333F	204	83	41%		deleterious	benign	1	
17	KRAS	missense	C/T	exonic	G13D	783	341	44%		deleterious	probably_damaging	1	1
19	SP140	splice	T/C	splice	_	219	83	37%		_	_		
21	NRAS	missense	G/T	exonic	Q61K	50	20	40%		deleterious	benign	1	1
24	DIC3	missense	C/T	exonic	E501K	240	20	8%	yes	deleterious	probably_damaging		
24	DIC3	missense	G/C	exonic	F120L	75	40	53%	yes	deleterious	probably_damaging		
24	IDH2	missense	G/A	exonic	T435M	608	398	65%	yes	tolerated	benign	1	
30	TRAF3IP1	missense	A/G	exonic	N351D	162	20	12%		tolerated	benign		
30	ACTG1	missense	G/C	exonic	A29G	623	65	10%		deleterious	probably_damaging	1	
32	BRAF	missense	C/T	exonic	D594N	307	79	26%		deleterious	probably_damaging	1	
32	TP53	missense	G/A	exonic	R273C	563	164	29%		deleterious	probably_damaging	1	1
32	KRAS	UTR 3'	A/C	UTR 3'	_	1489	407	27%		_	_		
32	DIC3	missense	A/C	exonic	Y782D	1969	851	43%		deleterious	probably_damaging		
33	KRAS	missense	T/A	exonic	Q61H	1590	212	13%		deleterious	benign	1	1
33	DIC3	missense		exonic	P635S	516	326	63%		tolerated	benign	1	?
34	RIPK4	missense	G/T	exonic	N498K	1771	38	2%		deleterious	probably_damaging		

Tabla suplementaria 1 (2/5): 168 mutaciones detectadas en los 79 pacientes de mieloma múltiple de nuevo diagnóstico.

SAMPLE	GENE	FUNC	Gtype	LOC	PTEIN	POS_COV	VAR_COV	VRF (%)	GERM	SIFT	POLYPHEN	COSMIC	dbSNP
34	IDH3A	missense	T/A	exonic	D139E	409	217	53%		deleterious	Probably_damaging	1	1
36	NR3C1	missense	C/T	exonic	A229T	232	109	47%		tolerated	benign		1
36	TP53	missense	A/G	exonic	Y126H	853	158	19%		deleterious	probably_damaging	1	
36	RB1	missense	G/C	exonic	A59P	214	181	85%		tolerated	benign		1
36	MYC	UTR 5'	C/T	UTR 5'	-	409	209	51%		-	-		1
39	GRB2	missense	C/G	exonic	R112P	401	143	36%		deleterious	probably_damaging	1	
39	IL6	missense	G/A	exonic	E200K	689	193	28%		deleterious	benign		
40	DIS3	missense	T/C	exonic	D479G	989	127	13%	yes	deleterious	probably_damaging	1	
40	TP53	missense	T/A	exonic	D208V	915	324	35%	yes	deleterious	probably_damaging	1	
40	TP53	nonsense	C/A	exonic	E204*	918	326	36%	yes	-	-	1	
42	DIS3	missense	C/A	exonic	D958Y	139	33	24%		deleterious	probably_damaging		
42	DIS3	missense	G/A	exonic	R820W	699	98	14%		deleterious	probably_damaging		1
42	WHSC1	missense	A/C	exonic	S421R	357	166	46%		tolerated	benign		
42	DIS3	missense	C/T	exonic	G249E	1125	226	20%		deleterious	probably_damaging	1	
45	BIRC2	missense	C/T	exonic	P500S	319	173	54%		tolerated	benign	1	
47	CYLD	missense	C/G	exonic	T386R	183	53	29%		deleterious	probably_damaging	1	
47	ATM	missense	C/G	exonic	S333F	195	86	44%		deleterious	benign	1	
47	ATM	missense	A/T	exonic	D1853V	134	100	75%		deleterious	benign	1	1
48	BRAF	missense	C/T	exonic	G466E	440	24	5%		deleterious	probably_damaging	1	1
48	TRAF3	nonsense	G/T	exonic	E332*	254	57	22%		-	-		
48	CDKN1B	missense	T/C	exonic	I119T	741	324	44%		tolerated	benign		1
48	RIPK4	missense	T/A	exonic	D669V	1436	688	48%		deleterious	probably_damaging		
55	NRAS	missense	C/T	exonic	G12D	757	376	50%	yes	deleterious	benign	1	1
62	BRAF	missense	C/G	exonic	G469A	1081	75	7%		deleterious	probably_damaging	1	1
62	PSMA1	UTR 3'	A/G	UTR 3'	-	405	155	38%		-	-		
62	KRAS	missense	G/T	exonic	A18D	937	389	42%		deleterious	probably_damaging	1	
65	NRAS	missense	C/G	exonic	G12A	2827	2073	73%		deleterious	benign	1	1
65	TRAF2	missense	G/A	exonic	D488N	3862	2535	66%		deleterious	probably_damaging		1
65	CDK7	missense	A/G	exonic	D16G	5199	3249	63%		deleterious	probably_damaging		
70	ATM	missense	C/G	exonic	L2379V	2331	1145	50%		deleterious	benign		
73	FGFR3	missense	G/T	exonic	G377C	552	67	12%		tolerated	benign		1
73	RASA2	missense	C/G	exonic	F585L	995	95	10%		deleterious	probably_damaging		
76	TRAF3	missense	G/C	exonic	K453N	604	46	8%		deleterious	probably_damaging		
76	TRAF3	missense	G/A	exonic	G416E	968	60	6%		deleterious	probably_damaging		
76	WHSC1	missense	G/C	exonic	D81H	862	65	8%		deleterious	probably_damaging		
76	TP53	missense	C/G	exonic	K139N	2129	68	3%		deleterious	probably_damaging	1	

Tabla suplementaria 1 (3/5): 168 mutaciones detectadas en los 79 pacientes de mieloma múltiple de nuevo diagnóstico.

SAMPLE	GENE	FUNC	Gtype	LOC	PTEIN	POS_COV	VAR_COV	VRF (%)	GERM	SIFT	POLYPHEN	COSMIC	dbSNP
76	CCNT1	missense	G/A	exonic	S292L	860	69	8%		tolerated	probably_damaging		
76	TRAF3	missense	C/G	exonic	F445L	888	116	13%		deleterious	probably_damaging		
76	TRAF2	missense	C/T	exonic	H307Y	2812	212	7%		deleterious	probably_damaging		
76	CUL4B	missense	C/G	exonic	E840Q	1521	495	33%		deleterious	probably_damaging		
76	B2M	missense	C/G	exonic	I21M	1180	522	44%		deleterious	benign		
76	BRAF	missense	G/A	exonic	S133L	1840	789	43%		deleterious	benign		
76	IKZF3	missense	C/T	exonic	M58I	1975	836	42%		tolerated	benign		
78	TNFSF9	missense	C/A	exonic	R150Q	518	237	46%		tolerated	benign		
79	DIS3	missense	T/C	exonic	E196G	292	20	6%		deleterious	probably_damaging		
79	FAM46C	missense	G/T	exonic	M215I	700	35	5%		deleterious	benign		
79	KRAS	missense	T/G	exonic	K117N	453	37	8%		deleterious	probably_damaging	1	
79	KRAS	missense	T/A	exonic	Q61L	1701	500	29%		deleterious	probably_damaging	1	1
86	CDKN1B	stoploss	A/T	exonic	*199Y	574	143	25%		—	—		
86	PSMB9	missense	C/T	exonic	R163C	438	166	38%		deleterious	probably_damaging		
86	MYC	missense	C/A	exonic	H302Q	362	182	50%		deleterious	probably_damaging	1	1
89	TP53	missense	A/T	exonic	N345K	250	20	8%		deleterious	probably_damaging	1	
96	CYLD	missense	C/G	exonic	Q820E	785	50	6%		deleterious	benign	1	
96	BIRC3	missense	A/G	exonic	D241G	1290	592	46%		tolerated	benign		
96	IFNGR2	missense	C/T	exonic	T299I	1272	619	49%		deleterious	benign		
101	WHSC1	missense	A/C	exonic	T569P	349	23	7%		deleterious	probably_damaging		
101	RASA2	stoploss	G/C	exonic	*850Y	266	29	11%		—	—		
101	KDM6A	nonsense	G/A	exonic	W127*	317	65	21%		—	—		
101	RB1	nonsense	G/A	exonic	W681*	2250	278	13%		—	—		
102	IRF4	missense	G/T	exonic	C214F	1040	482	46%		tolerated	benign		
103	GRB2	missense	C/T	exonic	A197T	244	114	47%		tolerated	benign		
103	KRAS	missense	T/G	exonic	Q61H	2938	389	13%		deleterious	benign	1	1
105	DIS3	missense	A/T	exonic	Y753N	2325	49	2%		deleterious	probably_damaging		
105	DIS3	missense	C/T	exonic	E126K	850	491	58%		deleterious	probably_damaging		
105	KRAS	missense	A/G	exonic	Q61H	5265	1633	32%		deleterious	benign	1	1
153	B2M	UTR 5'	C/A	UTR 5'	—	640	134	21%		—	—		
153	CSNK2A1	splice	T/C	splice	—	595	284	48%		—	—		
157	IGF1R	missense	A/G	exonic	N427S	691	21	3%		tolerated	benign		
157	BIRC3	missense	G/C	exonic	G127R	1006	125	12%		tolerated	benign		
159	IGF1R	missense	G/A	exonic	M1082I	1472	108	7%		deleterious	probably_damaging		
159	DIS3	missense	C/T	exonic	R689Q	408	346	85%		deleterious	probably_damaging	1	
168	BRAF	missense	A/T	exonic	T546S	969	29	3%	yes	c.1636A>T			

Tabla suplementaria 1 (4/5): 168 mutaciones detectadas en los 79 pacientes de mieloma múltiple de nuevo diagnóstico.

SAMPLE	GENE	FUNC	Gtype	LOC	PTEIN	POS_COV	VAR_COV	VRF (%)	GERM	SIFT	POLYPHEN	COSMIC	dbSNP
168	KRAS	missense	C/T	exonic	G13D	1174	106	9%	yes	deleterious	probably_damaging	1	1
168	KRAS	missense	A/G	exonic	Q61H	3019	393	13%	yes	deleterious	benign	1	1
169	ATM	missense	T/C	exonic	I144T	974	30	3%		deleterious	probably_damaging		
169	XBP1	missense	C/G	exonic	G315A	2625	63	3%		tolerated	probably_damaging		
169	TRAF2	missense	G/C	exonic	R393P	1137	66	6%		deleterious	probably_damaging		
169	MAF	missense	T/C	exonic	N275D	1039	78	8%		deleterious	probably_damaging		
169	IRF4	missense	G/C	exonic	D106H	3006	81	3%		deleterious	probably_damaging		
169	DIS3	missense	C/T	exonic	V198I	1419	614	43%		tolerated	benign		
172	RB1	nonsense	A/T	exonic	K722*	344	172	50%		-	-		
172	KRAS	missense	C/A	exonic	G12V	737	293	40%		deleterious	probably_damaging	1	1
172	CDKN2A	missense	C/T	exonic	A148T	2259	1107	49%		deleterious	probably_damaging		
177	NRAS	missense	G/T	exonic	Q61K	883	43	5%		deleterious	benign	1	1
177	NRAS	missense	C/G	exonic	G12A	1552	179	12%		deleterious	benign	1	1
177	PRDM1	missense	T/C	exonic	L784P	1127	559	49%		deleterious	probably_damaging		
185	NRAS	missense	C/G	exonic	G13R	803	20	2%		deleterious	probably_damaging	1	1
185	CARD11	missense	C/T	exonic	V903I	2666	1148	44%		deleterious	benign	1	1
189	KRAS	missense	C/G	exonic	G12R	1553	193	12%		deleterious	benign	1	1
189	STAT3	missense	G/A	exonic	L207F	3618	577	18%		tolerated	probably_damaging		
190	MAX	missense	C/T	exonic	R36K	609	59	10%		deleterious	probably_damaging	1	
190	MAX	missense	C/A	exonic	R35L	600	127	21%		deleterious	probably_damaging	1	
190	MAX	missense	T/A	exonic	E32V	565	146	26%		deleterious	probably_damaging		
190	PSMB9	missense	G/A	exonic	E112K	2885	1399	48%		deleterious	probably_damaging	1	
227	FAM46C	missense	exonic	exonic	A297T	413	314	76%		tolerated	benign	1	
230	TGFB2	UTR 5'	G/A	UTR 5'	-	174	66	38%		-	-		
230	IRF4	missense	G/C	exonic	K59N	3032	113	4%		deleterious	probably_damaging		
236	DIS3	missense	C/G	exonic	D479H	1335	55	4%		deleterious	probably_damaging		
236	DIS3	missense	C/G	exonic	D487H	1367	55	4%		deleterious	probably_damaging		
236	MAP3K14	missense	C/T	exonic	R404H	1424	146	10%		tolerated	benign	1	
236	DIS3	missense	G/T	exonic	D479E	1495	308	21%		deleterious	probably_damaging		
239	FAM46C	missense	G/A	exonic	R151H	1147	255	22%		deleterious	probably_damaging		
240	NRAS	missense	C/T	exonic	G12D	3166	418	13%	yes	deleterious	benign	1	1
252	ATM	missense	A/T	exonic	T2947S	783	38	5%	yes	deleterious	probably_damaging	1	
252	TP53	missense	T/C	exonic	Y236C	5327	257	5%	yes	deleterious	probably_damaging	1	
257	NRAS	missense	G/C	exonic	Q61E	285	21	7%	yes	deleterious	benign	1	1
257	NRAS	missense	C/G	exonic	G12A	1228	68	6%	yes	deleterious	benign	1	1
257	IFNGR2	missense	C/T	exonic	R39C	10347	3757	37%	yes	deleterious	probably_damaging		

Tabla suplementaria 1 (5/5): 168 mutaciones detectadas en los 79 pacientes de mieloma múltiple de nuevo diagnóstico.

SAMPLE	GENE	FUNC	Gtype	LOC	PTEIN	POS_COV	VAR_COV	VRF (%)	GERM	SIFT	POLYPHEN	COSMIC	dbSNP
268	IL6	missense	A/C	exonic		333	176	35%		-	-		1
268	FGFR3	missense	G/A	exonic	V790M	675	326	48%		deleterious	probably_damaging		1
268	IGF1R	missense	T/C	exonic	Y203H	1572	758	48%		tolerated	benign		
268	NRAS	missense	C/G	exonic	G13R	1865	928	50%		deleterious	probably_damaging	1	1
268	IFNGR2	missense	G/C	exonic		3911	1889	48%		deleterious	probably_damaging	1	1
269	KRAS	missense	A/C	exonic	Y71D	979	25	3%		deleterious	probably_damaging		
269	KRAS	UTR 3'	C/G	UTR 3'	-	5276	774	15%		-	-		
269	KRAS	missense	G/C	exonic	Q61E	11405	4133	37%		deleterious	benign	1	1
271	KRAS	missense	C/T	exonic	G13D	1447	609	42%		deleterious	possibly_damaging	1	1
271	FGFR3	missense	A/G	exonic	Y305C	1921	822	43%		deleterious	probably_damaging		
275	KRAS	missense	C/A	exonic	G12C	2179	479	22%		deleterious	probably_damaging	1	1
282	KRAS	missense	T/A	exonic	Q61H	6074	637	10%		deleterious	benign	1	1
282	PSMB9	missense	G/A	exonic	V32I	1796	828	46%		tolerated	probably_damaging		
283	TRAF3	missense	C/T	exonic	H136Y	677	76	11%		deleterious	probably_damaging		
283	BRAF	missense	A/T	exonic	V600E	947	345	36%		deleterious	probably_damaging	1	1
294	NRAS	missense	T/C	exonic	Q61R	85	35	41%		deleterious	benign	1	1
294	TNFRSF13B	missense	G/A	exonic	P205S	3759	1871	50%		tolerated	benign		
298	KRAS	missense	T/A	exonic	Q61H	3704	347	9%		deleterious	benign	1	1
303	KRAS	missense	G/T	exonic	Q22K	776	92	12%		deleterious	probably_damaging	1	1
303	TP53	missense	T/G	exonic	I251L	982	144	15%		deleterious	probably_damaging	1	1
303	PSMB8	missense	C/T	exonic	R11Q	1666	207	12%		tolerated	benign	1	
303	IFNGR2	missense	T/C	exonic	I223T	1038	290	28%		tolerated	benign		
303	CARD11	missense	C/T	exonic	R331H	1225	441	36%		tolerated	probably_damaging		
307	BRAF	missense	T/G	exonic	K601T	578	20	3%		deleterious	benign		
307	PRDM1	missense	T/G	exonic	L676R	1616	259	16%		deleterious	probably_damaging		
307	DIS3	missense	A/T	exonic	Y782N	3619	2427	68%		deleterious	probably_damaging		
309	BRAF	missense	C/T	exonic	D594N	566	70	12%		deleterious	probably_damaging	1	
309	DIS3	missense	C/G	exonic	D487H	1478	289	20%		deleterious	probably_damaging		
312	TNFRSF21	missense	T/C	exonic	N527S	574	180	31%		tolerated	benign		1
316	WHSC1	missense	G/C	exonic	K1351N	1084	532	49%		deleterious	unknown		

Tabla Suplementaria 2: Dosis ensayadas de cda fármaco testado en monoterapia, expresadas en μM . Las dosis de Bendamustina, Ciclofosfamida, Dexametasona y Prednisona fueron ajustadas conforme los resultados fueran analizados. Las dosis de Lenalidomida y Pomalidomida en los diferentes ensayos de depleción (Dep) y proliferación (Pro) distintas y se muestran en filas eparadas.

Fármaco	Dosis											
Bortezomib	0	0.0002	0.002	0.01	0.025	0.05	0.1	0.25	0.75			
Carfilzomib	0	0.0002	0.002	0.01	0.025	0.05	0.1	0.25	0.75			
Melfalán	0	0.3	1.5	3	6	7.5	9	12	15			
Bendamustina	0	2.34375	4.6875	9.375	18.75	37.5	75	150	300			
	0	5	25	50	100	150	200	250	300			
Ciclofosfamida	0	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100			
	0	5	10	20	40	50	60	80	100			
Dexametasona	0	0.0005	0.005	0.025	0.05	0.1	0.25	1	10			
	0	0.002	2	20	50	80	100	150	275			
Prednisona	0	0.00610352	0.02441406	0.09765625	0.390625	1.5625	6.25	25	50			
	0	0.002	2	20	50	80	100	125	150			
Talidomida (Dep)	0	0.00610352	0.02441406	0.09765625	0.390625	1.5625	6.25	25	100			
Lenalidomida (Dep)	0	0.00610352	0.02441406	0.09765625	0.390625	1.5625	6.25	25	100			
Lenalidomida (Prol)	0	0.005	0.05	0.5	5	50						
Pomalidomida (Dep)	0	0.00610352	0.02441406	0.09765625	0.390625	1.5625	6.25	25	100			
Pomalidomida (Prol)	0	0.000095	0.00035	0.0013	0.005	0.018	0.07	0.26	1			